

UNTERSUCHUNGEN ZUR BETEILIGUNG VERSCHIEDENER REDUKTASEN AN DER AKTIVIERUNG VON *N*- UND *S*-OXYGENIERTEN PRODRUGS



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von

ROBERT REH

Kiel 2007

Referent:

Korreferent:

Tag der mündlichen Prüfung:

Zum Druck genehmigt:

Prof. Dr. B. Clement

HD Dr. T. Kunze

29. November;

06. und 12. Dezember

Kiel, den 12. Dezember 2007

Prof. Dr. Jürgen Grotemeyer
(Dekan)

Für Lucy

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Absorption
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
<i>Aqua bidest.</i>	Zweifach destilliertes Wasser
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	2,2'-Bischinolin-4,4'-dicarbonsäure
Bfarm	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
BSA	Bovines Serum Albumin
CoA	Coenzym A
CYP	Cytochrom P450
Cyt	Cytochrom
DEAE	Dimethylaminoethyl
DLPC	L- α -Dilaurylphosphatidylcholin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPSO	Diphenylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EM	Emission
EX	Extinktion
FAD	Flavinadenindinukleotid
FMO	Flavinhaltige Monooxygenase
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
hMsrA	humane Methioninsulfoxidreduktase A
HEPES	<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)-piperazin- <i>N'</i> -(2-ethansulfonsäure)
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
HMCS-CT	C-Terminus der humanen Mocosulfurase
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
IC ₅₀	für eine halbmaximale Hemmung nötige Konzentration
IgG	Immunglobulin G
Kap.	Kapitel
kDa	Kilodalton
log <i>P</i>	Verteilungskoeffizient (Octanol/Wasser)

mARC	mitochondriale amidoximreduzierende Komponente (mitochondrial amidoxime reducing component)
min	Minute
Moco	Molybdäncofaktor
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
Msr	Methioninsulfoxidreduktase
m/v	Masse/Volumenverhältnis
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form)
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
ND	nicht detektierbar
nm	Nanometer
OMV	äußere Membranfraktion (outer membrane vesicles)
pH	Wasserstoffionenkonzentration
<i>p</i> -HMB	<i>p</i> -Hydroxymercuribenzoat
ox.	oxidiert
red.	reduziert
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RP	Umkehrphase (reversed phase)
s	Sekunde
SCD	Stearoyl-CoA Desaturase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEL-MsrB	selenhaltige Methioninsulfoxidreduktase B
Tab.	Tabelle
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)ethylendiamin
U	Unit
U/min	Umdrehungen pro Minute
u. a.	unter anderem
UV	ultraviolett
v/v	Volumenverhältnis

1	EINLEITUNG	1
<hr/>		
1.1	BIOTRANSFORMATION	1
1.2	BEDEUTUNG	1
1.2.1	Biotransformationsreaktionen	2
1.2.2	Enzyme der Biotransformation	2
1.3	DAS PRODRUGPRINZIP	4
1.3.1	<i>N</i> -hydroxylierte Verbindungen als Prodrugs	5
1.3.2	Sulfoxide als potentielle Prodrugs	9
1.4	BIOTRANSFORMATION <i>N</i>-HYDROXYLIERTER VERBINDUNGEN	11
1.5	BIOTRANSFORMATION SCHWEFELHALTIGER FUNKTIONELLER GRUPPEN	13
1.6	THEMA UND ZIELSETZUNG	14
2	UNTERSUCHUNGEN ZUR REDUKTION VON THIOANISOL-SULFOXID	15
<hr/>		
2.1	EINLEITUNG	15
2.1.1	Biotransformation thioetherhaltiger funktioneller Gruppen	15
2.1.2	Molybdoenzyme und Sulfoxidreduktionen	17
2.1.3	Thema und Zielsetzung	18
2.2	METHODEN	20
2.2.1	Materialien und Geräte	20
2.2.2	Gewinnung porciner Lebermitochondrien	20
2.2.3	Gereinigte Enzympräparationen aus Mitochondrien	20
2.2.4	C-Terminus der Moco-Sulfurase	21
2.2.5	Gewinnung von Zytosol und Mikrosomen aus porciner Leber	21
2.2.6	Gewinnung der Komponenten des Benzamidoximreduktasesystems aus Lebermikrosomen	21
2.2.6.1	Cytochrom b ₅ (Cyt b ₅)	21

2.2.6.2	NADH-Cyt b ₅ -Reduktase	21
2.2.6.3	Mikrosomale Benzamidoximreduktase	22
2.2.7	Analytik der Enzymcharakterisierung	22
2.2.7.1	Proteingehalt	22
2.2.7.2	Cyt b ₅ -Gehalt	22
2.2.7.3	NADH-Cyt b ₅ -Reduktaseaktivität	23
2.2.7.4	Cytochrom P450-Gehalt	23
2.2.8	<i>In vitro</i> Biotransformation	23
2.2.8.1	Inkubationsansatz mit Mikrosomen, Mitochondrien und Zytosol	23
2.2.8.2	Inkubationsansatz mit dem rekonstituierten System	24
2.2.9	HPLC-Analytik	24
2.3	ERGEBNISSE	26
2.3.1	Optimierung der Thioanisolsulfoxidreduktion	26
2.3.2	Reduktion mit Mikrosomen	29
2.3.3	Reduktion mit dem mikrosomalen rekonstituierten System	30
2.3.4	Reduktion mit Mitochondrien	30
2.3.5	Reduktion mit der äußeren mitochondrialen Membran (OMV)	31
2.3.6	Reduktion mit dem mitochondrialen rekonstituierten System	31
2.3.7	Reduktion mit Zytosol	32
2.3.8	Vergleich der DTT-abhängigen Thioanisolsulfoxidreduktion	33
2.3.9	Reduktion von Thioanisolsulfoxid mit rekombinanter humaner Methioninsulfoxidreduktase (hMsrA)	34
2.4	DISKUSSION	35
2.5	ZUSAMMENFASSUNG	37
3	UNTERSUCHUNGEN MIT DER METHIONINSULFOXID-REDUKTASE	38
3.1	EINLEITUNG	38
3.1.1	Humane Methioninsulfoxidreduktase (hMsr)	38
3.1.1.1	Thioredoxin/Thioredoxinreduktase	42
3.1.1.2	Mechanismus der hMsrA-katalysierten Reaktion	42
3.1.1.3	Biologische Bedeutung	44
3.1.2	Thema und Zielsetzung	45

3.2	METHODEN	47
3.2.1	Materialien und Geräte	47
3.2.2	Enzymquellen	47
3.2.3	<i>In vitro</i> Reduktion von Methioninsulfoxid	47
3.2.3.1	Inkubationsbedingungen	47
3.2.3.2	Inkubationsansatz mit Mikrosomen und Mitochondrien	47
3.2.3.3	Inkubationsansatz mit dem rekonstituierten System	48
3.2.3.4	Inkubationsansatz mit der rekombinanten hMsrA (Aktivitätstest)	48
3.2.3.5	HPLC-Analytik	49
3.2.4	Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch die humane MethioninsulfoxidreduktaseA (hMsrA)	50
3.2.4.1	Inkubationsansatz mit rekombinanter hMsrA	50
3.2.4.2	Inkubationsbedingungen	51
3.2.4.3	HPLC-Analytik	51
3.3	ERGEBNISSE	52
3.3.1	Enzymatische Reduktion von Methioninsulfoxid	52
3.3.1.1	Reduktion in Mikrosomen und Mitochondrien	52
3.3.1.2	Reduktion mit dem mikrosomalen rekonstituierten System	53
3.3.1.3	Reduktion mit der hMsrA (Aktivitätstest)	53
3.3.2	Reduktion von Benzamidoxim mit der hMsrA	53
3.4	DISKUSSION	54
3.5	ZUSAMMENFASSUNG	56
4	BETEILIGUNG DER STEAROYL-COA DESATURASE (SCD) AN DER REDUKTION VON <i>N</i>-HYDROXYAMIDINEN (AMIDOXIMEN) IM PORCINEN FETTGEWEBE	57

4.1	EINLEITUNG	57
4.1.1	Fettgewebe	57
4.1.2	Stearoyl-CoA Desaturase	59
4.1.2.1	Mechanismus	60
4.1.2.2	Eigenschaften	62
4.1.2.3	Physiologische Funktionen	64
4.1.2.4	Isoformen	64
4.1.3	Thema und Zielsetzung	66

4.2	METHODEN	68
4.2.1	Materialien und Geräte	68
4.2.2	Enzymquellen	68
4.2.2.1	Mikrosomengewinnung aus porcinem subkutanen Fettgewebe	68
4.2.2.2	Teilgereinigte Stearoyl-CoA Desaturase (SCD)	69
4.2.3	Analytik der Mikrosomencharakterisierung	69
4.2.4	SDS-PAGE	69
4.2.4.1	Puffer und Lösungen	69
4.2.4.2	Zusammensetzung des Gels	70
4.2.4.3	Probenvorbereitung und Probenauftrag	70
4.2.4.4	Durchführung der Gelelektrophorese	71
4.2.5	Westernblot	71
4.2.5.1	Puffer und Lösungen	71
4.2.5.2	Durchführung und Detektion	72
4.2.6	<i>In vitro</i> Biotransformation des Benzamidoxims	73
4.2.6.1	Inkubationsansatz mit Mikrosomen	73
4.2.6.2	Inkubationsansatz mit teilgereinigter SCD im rekonstituierten System	73
4.2.6.3	Inkubationsansatz mit teilgereinigter SCD im rekonstituierten System in Abhängigkeit vom Cyt b ₅ -/NADH-Cyt b ₅ -Reduktaseverhältnis	73
4.2.7	Inhibitorstudien	74
4.2.7.1	<i>p</i> -Hydroxymercuribenzoat	74
4.2.7.2	Cytochrom c	74
4.2.7.3	Kaliumhexacyanoferrat(III)	74
4.2.7.4	Kaliumcyanid	74
4.2.7.5	Kohlenmonoxid	75
4.2.7.6	Stearoyl-CoA	75
4.2.7.7	Natriumvanadat	75
4.2.7.8	Anti-SCD Antikörper	75
4.2.8	HPLC-Analytik	75
4.2.9	SCD - Aktivitätstest	77
4.3	ERGEBNISSE	78
4.3.1	Cyt b ₅ /NADH-Cyt b ₅ -Reduktase	78
4.3.2	Mikrosomen aus porcinem subkutanen Fettgewebe	79
4.3.2.1	Gehalts- und Aktivitätsbestimmungen	79
4.3.2.2	Bedeutung der Komponenten des mikrosomalen Elektronentransfersystems für die Benzamidoximreduktion im Fettgewebe	80
4.3.2.2.1	<i>p</i> -Hydroxymercuribenzoat	81
4.3.2.2.2	Kaliumhexacyanoferrat(III)	82
4.3.2.2.3	Cytochrom c	83

4.3.2.3	Benzaminoximreduktion mit Mikrosomen aus porcinem Fettgewebe	84
4.3.2.4	Einfluss von Kaliumcyanid und Kohlenmonoxid auf die <i>N</i> -reduktive Aktivität	85
4.3.2.5	Hemmung der <i>N</i> -reduktiven Aktivität durch Stearoyl-CoA	87
4.3.2.6	Hemmung der <i>N</i> -reduktiven Aktivität durch Natriumvanadat	88
4.3.2.7	Einfluss eines Anti-SCD Antikörpers auf die <i>N</i> -reduktive Aktivität porciner Fettgewebsmikrosomen	89
4.3.3	Teilgereinigte Desaturase-induzierte Rattenlebermikrosomen	90
4.3.3.1	Gehalts- und Aktivitätsbestimmungen	90
4.3.3.2	Benzaminoximreduktion mit teilgereinigter SCD im rekonstituierten System	91
4.3.3.3	Benzaminoximreduktion im rekonstituierten System in Abhängigkeit vom Cyt b ₅ /NADH-Cyt b ₅ -Reduktaseverhältnis	92
4.3.3.4	Einfluss eines Anti-SCD Antikörpers auf die <i>N</i> -reduktive Aktivität teilgereinigter Desaturase-induzierter Rattenlebermikrosomen im rekonstituierten System	93
4.3.4	SCD - Aktivitätstest	94
4.3.5	Westernblot	95
4.4	DISKUSSION	96
4.5	ZUSAMMENFASSUNG	102
5	ZUSAMMENFASSUNG	104

6	MATERIALIEN UND GERÄTE	107
----------	-------------------------------	------------

6.1	SUBSTANZEN UND SONSTIGE MATERIALIEN	107
6.2	GERÄTE	109

7	LITERATURVERZEICHNIS	111
----------	-----------------------------	------------

1 EINLEITUNG

1.1 Biotransformation

Als Biotransformation wird die chemische Modifizierung von Substanzen durch Stoffwechselprozesse in Organismen bezeichnet [Steinhilber *et al.*, 2005]. Im Allgemeinen werden dabei lipophile Verbindungen in hydrophilere überführt, damit diese leichter ausgeschieden werden können.

1.2 Bedeutung

Bei physiologischen Stoffwechselprozessen fallen häufig sehr lipophile, schlecht wasserlösliche Verbindungen (z. B. Steroidhormone) an, die nicht direkt ausgeschieden werden können, sondern erst in ihre hydrophileren Metabolite umgewandelt werden müssen. Neben physiologischen Abbauprodukten des Körpers werden auch vom Menschen aufgenommene Fremdstoffe sogenannte Xenobiotika (u. a. Umweltgifte, Nahrungsmittelzusätze und Arzneistoffe) [Testa, 1995] metabolisiert, um deren Ausscheidung zu erleichtern und damit beispielsweise eine Akkumulation dieser häufig recht lipophilen Verbindungen im Fettgewebe zu verhindern [Mutschler *et al.*, 2001].

Einige Substanzen können eine Enzyminduktion bewirken. Dies bedeutet, dass der Körper verstärkt metabolisierende Enzyme bildet, um die Biotransformation und damit die Ausscheidung dieser Substanzen zu beschleunigen und somit einer Kumulation entgegenzuwirken [Donato *et al.*, 1995].

Vor allem bei der Arzneistoffentwicklung ist es von Bedeutung, enzyminduzierende Eigenschaften von Arzneistoffkandidaten früh zu erkennen und wenn möglich zu vermeiden.

Die Kenntnis der für den Metabolismus von Arzneistoffkandidaten verantwortlichen Enzyme ist ebenfalls von besonderem Interesse, um mögliche Interaktionen zweier Arzneistoffe vorhersagen zu können. So können zwei Arzneistoffe, die von einem Enzym metabolisiert werden, aufgrund von unterschiedlichen Affinitäten dieser Substanzen zu diesem Enzym unterschiedlich schnell eliminiert werden. Dies führt zu

starken Abweichungen von den eigentlich erwarteten Plasmaspiegeln, was wiederum gerade bei Arzneistoffen mit geringer therapeutischer Breite mitunter fatale Folgen nach sich ziehen kann.

1.2.1 Biotransformationsreaktionen

Generell können Biotransformationsreaktionen in zwei Phasen (Phase I und Phase II) eingeteilt werden. In Phase I werden durch Oxidationen, Reduktionen, Hydrolysen und Eliminationen funktionelle Gruppen (-OH, -SH, NH₂) in unpolare Moleküle eingeführt. Während in Phase II durch Transferasen katalysierte Konjugationsreaktionen ablaufen. Dabei werden die bereits vorhandenen oder die in Phase I eingeführten funktionellen Gruppen zur Konjugation mit endogenen, hydrophilen Molekülen (z. B. Glucuronsäure, Schwefelsäure, Aminosäuren, Glutathion) genutzt. Die entstandenen Verbindungen weisen danach eine derart verbesserte Wasserlöslichkeit auf, dass sie über die Nieren oder über die Galle ausgeschieden werden können [Testa, 1995].

Bei einigen Substanzen können durch Biotransformationsreaktionen auch Metaboliten entstehen, die karzinogene, zytotoxische, mutagene oder teratogene Eigenschaften besitzen. Bei diesen Bioaktivierungsreaktionen, die zu toxischen Produkten führen, spricht man von Biotoxifizierung oder Giftung [Park *et al.*, 1995; Testa, 1995].

1.2.2 Enzyme der Biotransformation

Die genaue Kenntnis von Biotransformationsreaktionen und den daran beteiligten Enzymen ermöglicht im Vorfeld eine Abschätzung der entstehenden Metaboliten. In der Arzneistoffentwicklung ist dies von Interesse, um die Metaboliten des Arzneistoffkandidaten auf pharmakologische Wirkung, Mutagenität, Enzyminduktion u. a. untersuchen zu können.

Das Organ mit der größten Bedeutung für den Metabolismus von Xenobiotika im Menschen ist die Leber [Pond und Tozer, 1984; Jounaidi, 2002]. Aber auch in anderen Organen und Geweben, wie z. B. in Niere, Lunge, Gehirn, Haut und Darm finden fremdstoffmetabolisierende Reaktionen statt [Kuschinsky *et al.*, 1993].

Die an der Biotransformation beteiligten Enzyme zeichnen sich allgemein durch eine

breite Substratspezifität aus [Testa, 1995; Mutschler *et al.*, 2001]. Sie liegen entweder membrangebunden im Endoplasmatischen Retikulum und in den Mitochondrien vor oder sind als lösliche Enzyme im Zytoplasma zu finden.

Während die Konjugationsreaktionen der Phase II von Transferasen katalysiert werden, sind an den Phase I Reaktionen zahlreiche verschiedene Enzyme beteiligt. Gut untersucht ist bislang die Gruppe der Cytochrom P450-Enzyme (CYPs), denen die größte Bedeutung unter den membrangebunden Enzymen zu teil wird [Guengerich, 2001]. Das am häufigsten vorkommende Isoenzyme in der Leber ist CYP 3A4. Dieses ist am Metabolismus von mehr als zwei Drittel aller auf dem Markt befindlichen Arzneistoffe beteiligt [Wrighton *et al.*, 2000]. Außer den Cytochrom P450-Isoenzymen sind noch weitere am Phase I Metabolismus beteiligte membranständige Enzymfamilien bekannt. Dazu gehören die Flavinhaltigen Monooxygenasen (FMO's) [Ziegler, 1988], sowie die NADPH-Cytochrom P450-Reduktase [Nebert und Gonzales, 1987].

Neben den FMO's gibt es aber auch noch weitere nicht zu vernachlässigende Katalysatoren, die nicht P450-haltig sind und ebenfalls Redoxreaktionen der Phase I katalysieren. Zu diesen löslichen Enzymen zählen die Alkohol- und Aldehyddehydrogenase, Xanthinoxidase sowie verschiedene Esterasen und Monoaminoxidasen [Beedham, 1997; Testai, 2001].

Da es sich bei Phase I Reaktionen zumeist um Redoxreaktionen handelt, also Reaktionen mit Elektronenübergang, benötigen viele dieser Enzyme ein Elektronentransfersystem. Diese dienen der Übertragung von Elektronen auf ein terminales Enzym, welches dann die eigentliche Redoxreaktion unter Elektronenauf- bzw. Elektronenabnahme katalysiert. Das terminale Enzym liegt nach der Reaktion entweder in reduzierter oder oxidierten Form vor und kann durch das entsprechende Elektronentransfersystem wieder in seinen aktiven Ausgangszustand zurückversetzt werden.

1.3 Das Prodrugprinzip

Prodrugs sind therapeutische Wirkstoffe, die *per se* inaktiv sind, aber in einen oder mehrere aktive Metaboliten umgewandelt werden können [Albert, 1958].

Das Ziel der Einführung einer Prodruggruppe besteht zumeist in der Verbesserung der Bioverfügbarkeit der daraus resultierenden Verbindungen [Ettmayer *et al.*, 2004]. So können durch die Einführung von funktionellen Gruppen bestimmte Substanzeigenschaften wie z. B. die Basisizität oder die Lipophilie verändert werden, um die passive Resorption zu verbessern. Es können aber auch Reste an den Wirkstoff angefügt werden (z. B. Aminosäuren), die dann das Wirkstoffmolekül für einen bestimmten Transporter markieren, wodurch der Wirkstoff aktiv aufgenommen werden kann. Zwar sind auch rein chemische Prodrugaktivierungen (z. B. Hydrolysen) möglich, aber weitaus häufiger sind die enzymatisch katalysierten Aktivierungsreaktionen anzutreffen [Ettmayer *et al.*, 2004].

Das erstmals von Tréfouel *et al.* [1935] beschriebene Prinzip der Bioaktivierung von Substanzen findet heute intensive Anwendung in der Arzneistoffentwicklung (Abb. 1.1).

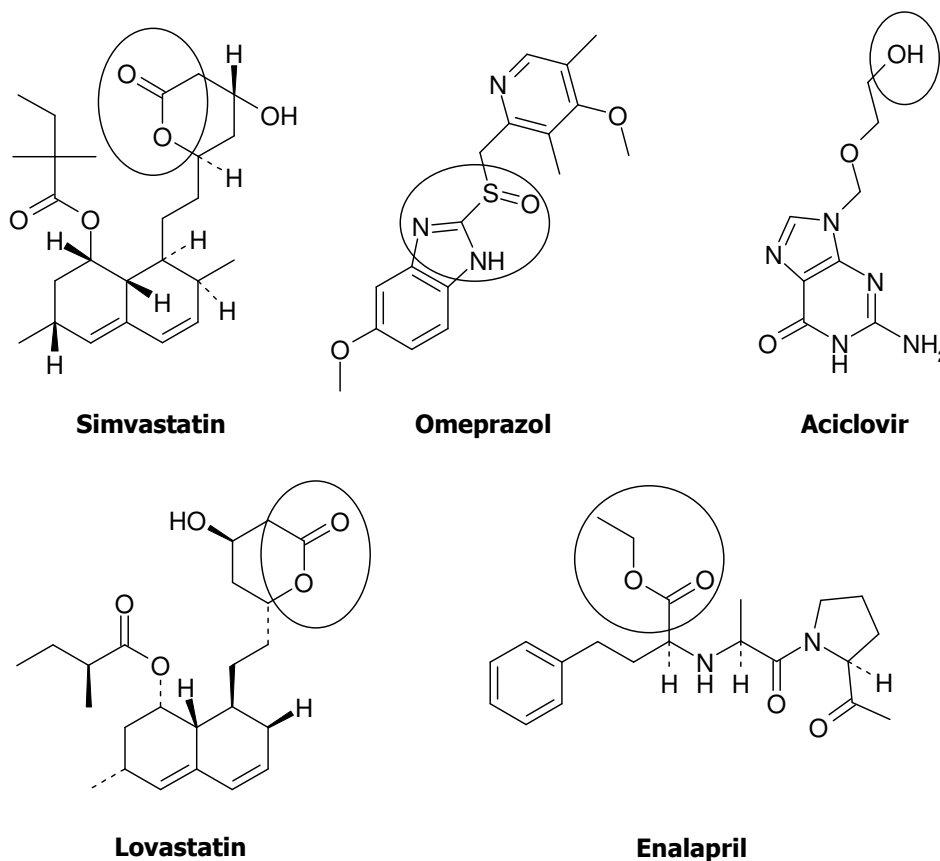


Abb. 1.1 Blockbuster Prodrugs [Ettmayer *et al.*, 2004].

1.3.1 *N*-hydroxylierte Verbindungen als Prodrugs

Im Gegensatz zu Oxidationsreaktionen, die häufig zu hydrophileren Metaboliten führen und somit deren Ausscheidung aus dem Körper unterstützen, ist die physiologische Bedeutung von Reduktionsreaktionen im Rahmen der Biotransformation nicht eindeutig.

Für einige *N*-hydroxylierte Amidine wurde ein erhöhtes genotoxisches Potential im Vergleich zu den reduzierten Metaboliten beobachtet, so dass die Reduktion als eine Entgiftungsreaktion für diese Verbindungen betrachtet werden kann [Clement *et al.*, 1988a; 1996].

Stickstoffatome sind in der Mehrzahl aller Wirkstoffe anzutreffen. Insbesondere in Amidin- und Guanidinfunktionen zeichnen sich Stickstoffatome durch eine starke Basizität aus. Dies ist ursächlich dafür, dass die Stickstoffatome dieser funktionellen Gruppen unter physiologischen Bedingungen protoniert als hydrophile Amidiniumkationen vorliegen. Durch die positive Ladung ist die Resorption dieser Verbindungen im Gastrointestinaltrakt stark behindert. Aus diesem Grund weisen Amidine und Guanidine häufig eine sehr geringe orale Bioverfügbarkeit auf.

Durch *N*-Hydroxylierung eines Stickstoffatoms in der Amidin- bzw. Guanidinfunktion kann die Basizität dieser Verbindungen gesenkt werden, so dass diese dann unter physiologischen Bedingungen unprotoniert als freie Basen vorliegen [Clement, 1998; Ettmayer *et al.*, 2004]. Die freie Base weist eine derart verbesserte orale Bioverfügbarkeit auf, dass eine orale Applikation dieser Verbindungen möglich ist.

Die Einführung der Hydroxylgruppe bedeutet für diese Verbindungen eine Bioinaktivierung, das heißt den Verlust der gewollten pharmakologischen Wirkung. Erst durch die enzymatisch katalysierte reduktive Abspaltung der Hydroxylgruppe wird die biologische Aktivität der Verbindung im Körper wieder hergestellt (Bioaktivierung). Die Anwendung des von Clement *et al.* [1985; 1995; 2002] entwickelten Prodrug-Prinzips Amidoxime anstelle von Amidinen trägt zur Verbesserung der oralen Bioverfügbarkeit von Verbindungen mit Amidin- oder Guanidinfunktionen bei [Ettmayer *et al.*, 2004] (Abb. 1.2).

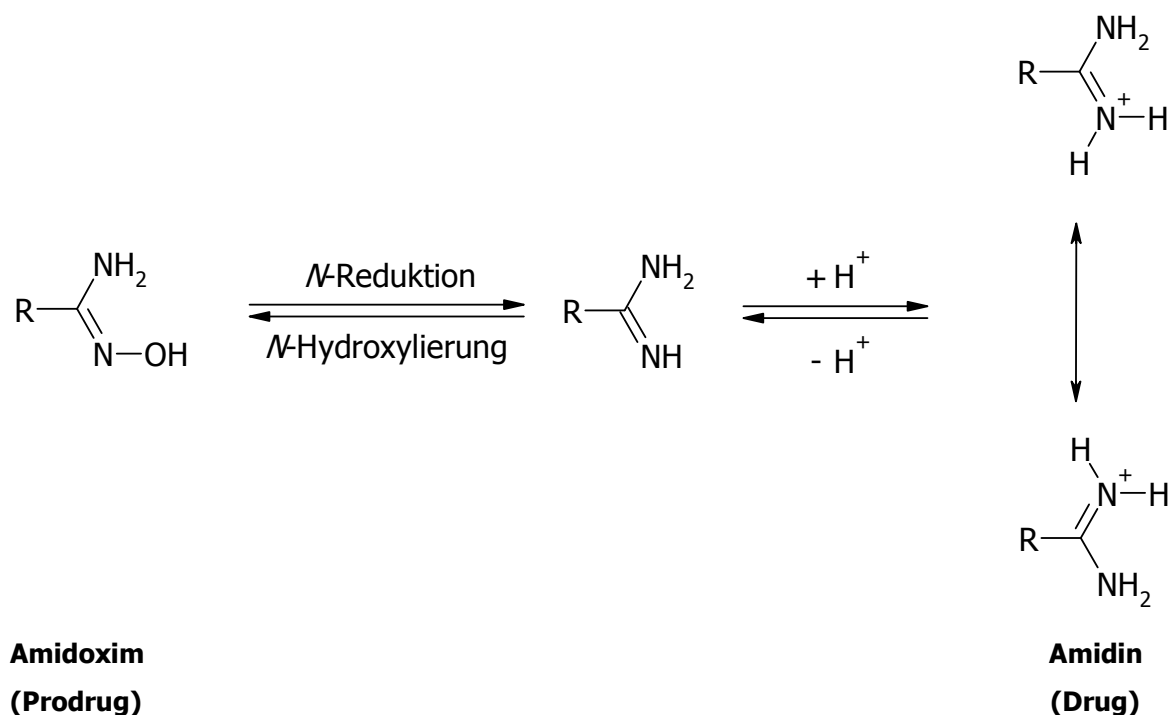


Abb. 1.2 Amidoxime als Prodrugs von Amidinen.

Amidin- und Guanidinstrukturen sind Bestandteil vieler Arzneistoffe, so dass das Amidoxim-Prodrugprinzip erfolgreich auf mehrere dieser Verbindungen übertragen werden konnte. Verbindungen mit Amidinfunktionen sind vor allem unter den antiparasitär wirksamen Stoffen und unter den Antikoagulanzen zu finden.

Mit dem Ximelagatran (Exanta[®]) kam der erste oral bioverfügbare Thrombininhibitor auf den Markt [Gustafsson *et al.*, 2001; Clement und Lopian, 2003]. Ximelagatran (Abb. 1.3) weist neben der Amidoximfunktion zusätzlich noch eine veresterte Carboxylgruppe auf und gehört somit ebenso wie der für die Krebstherapie entwickelte Urokinaseinhibitor WX 671 (Abb. 1.4) zu den bifunktionellen Prodrugs. Ximelagatran wurde jedoch 2006 zusammen mit seinem wirksamen Metaboliten Melagatran weltweit vom Markt genommen [BfArm, Pressemitteilung vom 14.02.2006]. Als Ursache wurden vorübergehende Transaminaseerhöhungen bei ca. 7% der Patienten genannt [Mitteilung AstraZeneca]. Ein Zusammenhang zwischen dieser beobachteten Nebenwirkung und der Prodrugfunktion konnte bislang nicht gezeigt werden. Die Entwicklung vieler anderer Amidoximprodrugs [Peterlin-Masic *et al.*, 2006] wird somit fortgesetzt.

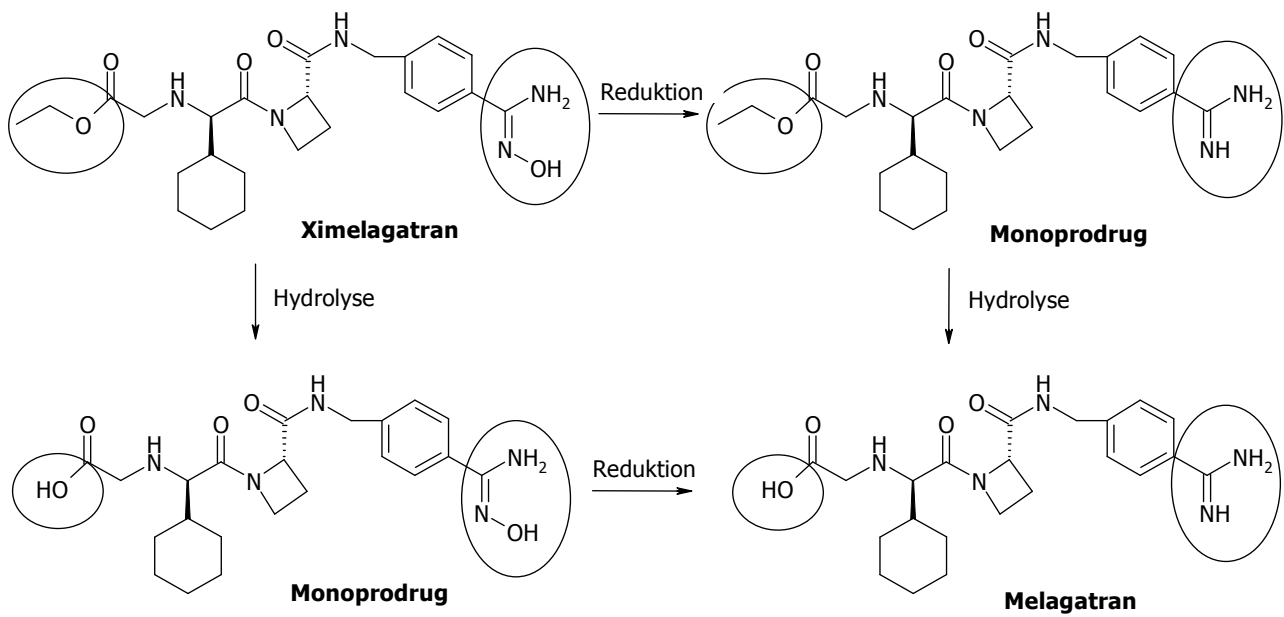


Abb. 1.3 Aktivierung des Doppelprodrugs Ximelagatran.

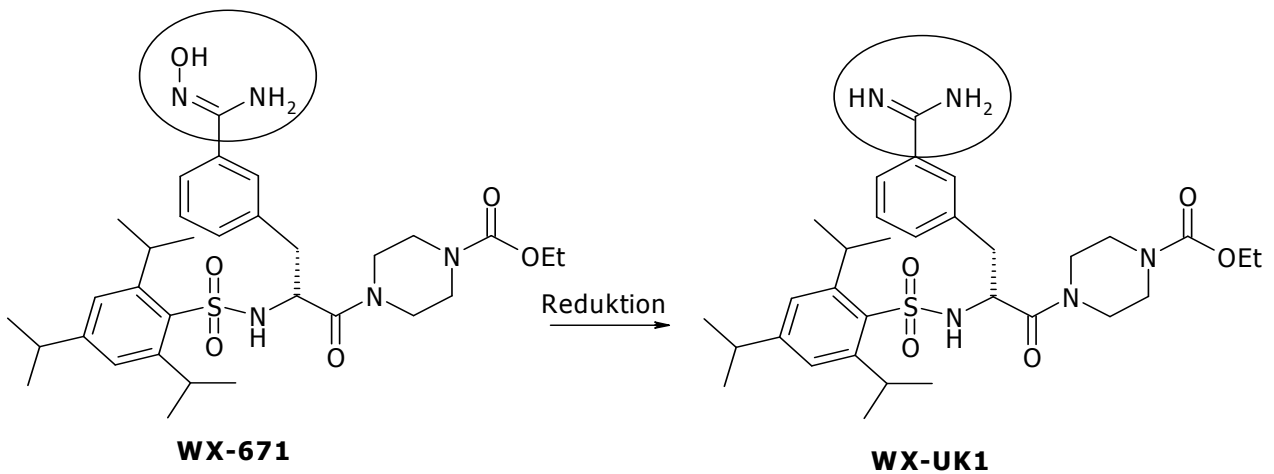


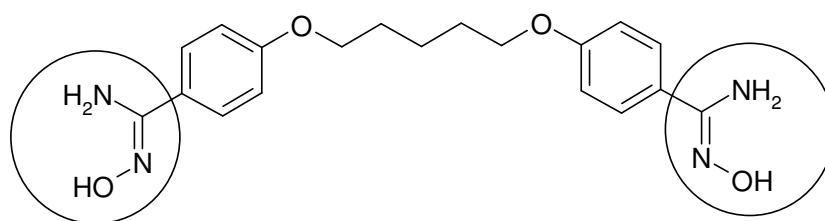
Abb. 1.4 WX 671 das Prodrug des Urokinaseinhibitors WX-UK1.

Das trypanozid und leishmanizid wirkende Pentamidin (Abb. 1.5) zählt zu den ersten Wirkstoffen, bei denen das Prinzip von Amidoximen als Prodrug von Amidinen angewandt wurde [Clement *et al.*, 1992; Clement, 1995].

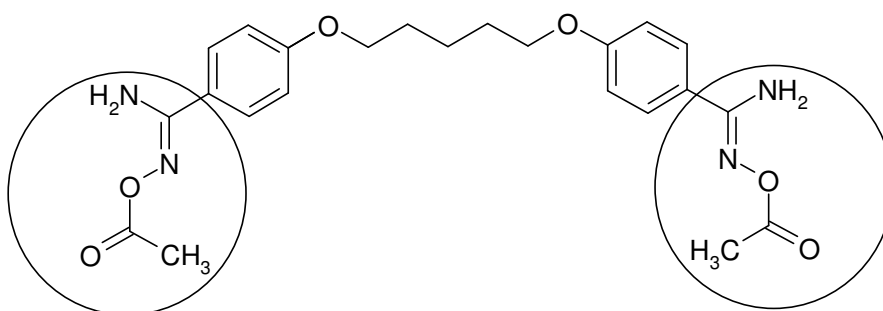
Durch eine *N*-Hydroxylierung beider Amidinfunktionen wurde es zum korrespondierenden Amidoxim-Prodrug umgewandelt. Mit dem Ziel, die Lipophilie des dihydroxylierten Pentamidins weiter zu erhöhen, wurde das *N,N'*-Dihydroxy-

pentamidin zusätzlich diacetyliert.

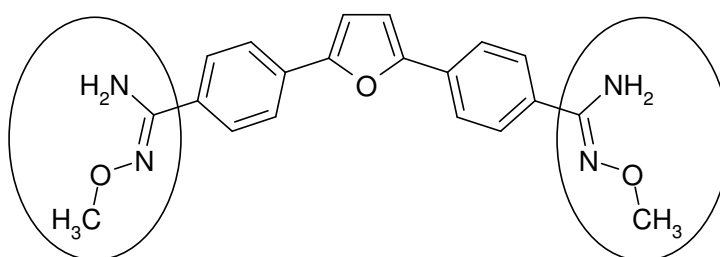
Die angewandte Prodrugfunktion für das Furamidin-Prodrug DB289 [Saulter *et al.*, 2005] (Abb. 1.5) ist der des acetylierten *N,N'*-Dihydroxypentamidin sehr ähnlich. Anstelle einer Acetylierung der Amidoximgruppe wurde hierbei eine *O*-Methylierung vorgenommen.



Pentamidin-Prodrug (*N,N'*-Dihydroxypentamidin)



Pentamidin-Prodrug (1,5-Bis(4'-acetoamidinophenoxy)pentan)



Furamidin-Prodrug (DB289)

Abb. 1.5 Anitparasitär wirksame Verbindungen mit Prodrugfunktionen.

1.3.2 Sulfoxide als potentielle Prodrugs

Die Oxidation von Thioethern zu Sulfoxidverbindungen bewirkt eine drastische Verringerung der Lipophilie. Durch Betrachtung der $\log P$ -Werte (ein Maß für die Lipophilie einer Substanz) des Modellsubstrates Thioanisol und seiner *S*-oxidierten Form wird dieser Zusammenhang deutlich. Der experimentell bestimmte $\log P$ für Thioanisol beträgt 2,74 [Suzuki, 1991] und unterscheidet sich damit praktisch nicht von dem des Toluols (2,62) [Suzuki, 1991], während für das Thioanisolsulfoxid ein $\log P$ von 0,55 ermittelt wurde [Hansch *et al.*, 1995]. Der deutliche Unterschied in der Lipophilie dieser beiden Substanzen spiegelt sich auch in deren Wasserlöslichkeit wieder. So ist die oxidierte Form gut wasserlöslich, während Thioanisol praktisch wasserunlöslich ist. Dies verdeutlicht, dass durch Einführung einer Sulfoxidgruppe die Lipophilie einer Substanz gesenkt werden kann.

Zahlreiche Arzneistoffe mit Schwefelfunktionen sind auf dem Markt etabliert. Bis *dato* ist jedoch mit dem nicht steroidalen Antirheumatikum Sulindac lediglich ein Arzneistoff mit einer funktionellen Sulfoxidgruppe bekannt, der als Prodrug fungiert. Zur Anwendung von funktionellen Sulfoxidgruppen in der Prodrugentwicklung ist die Kenntnis der an der Prodrugaktivierung beteiligten Enzyme von großem Interesse.

Für eine Erfolg versprechende Prodrugentwicklung sollten die an der Aktivierung beteiligten Enzyme möglichst selektiv im Zielgewebe eine hohe Aktivität und Expressionsrate besitzen. Zur Vermeidung von Interaktionen mit dem Metabolismus anderer Arzneistoffe ist es zu dem von Vorteil, wenn das an der Aktivierung beteiligte Enzym nicht zur P450-Familie gehört.

Die Reduktion von Sulfoxiden unter anaeroben Bedingungen durch die Aldehyd-oxidase ist seit langem bekannt [Felsted *et al.*, 1973; Tatsumi *et al.*, 1983]. Zum einen aber sind die Umsatzraten dieses Enzyms für die Sulfoxidreduktionen recht gering und zum anderen ist die *in vivo* Relevanz anaerober Reduktionen in gut durchbluteten Geweben wie z. B. dem Lebergewebe fraglich. In Tumorgeweben wurden jedoch sowohl hypoxische Bedingungen als auch Reduktasen nachgewiesen, was einen möglichen Ansatzpunkt für die Therapie mit Prodrugs darstellen könnte [Patterson *et al.*, 1999].

Eine enzymatische Reduktion von Methylsulfoxidgruppen zum Methylthioether konnte für das nicht steroidale Antirheumatikum Sulindac (Abb. 1.6) gezeigt werden. Das Interesse am sulfoxidreduktiven Metabolismus des Sulindacs beruht auf der Entdeckung des pharmakologisch wirksamen Metaboliten mit der zum Methylthioether reduzierten Methylsulfoxidgruppe [Duggan *et al.*, 1977]. Somit wurde das auf der Reduktion von Methylsulfoxidgruppen basierende Prodrugprinzip eher zufällig entdeckt. Auf der Suche nach den für die Reduktion des Sulindacs verantwortlichen Enzymen wurde unter anaeroben Bedingungen die Aldehydoxidase [Duggan *et al.*, 1980; Kitamura *et al.*, 1981] und unter aeroben Bedingungen die Methioninsulfoxidreduktase identifiziert, wobei der Methioninsulfoxidreduktase die größere Bedeutung für diese Reduktion zuzuschreiben ist [Etienne *et al.*, 2003]. Obwohl mit Sulindac seit Jahren ein bewährter Arzneistoff mit einer als Prodrug fungierenden Methylsulfoxidgruppe auf dem Markt ist, ist bis *dato* noch kein Arzneistoff bekannt, bei dem dieses Prodrugprinzip bereits in der Entwicklung bewusst eingesetzt wurde.

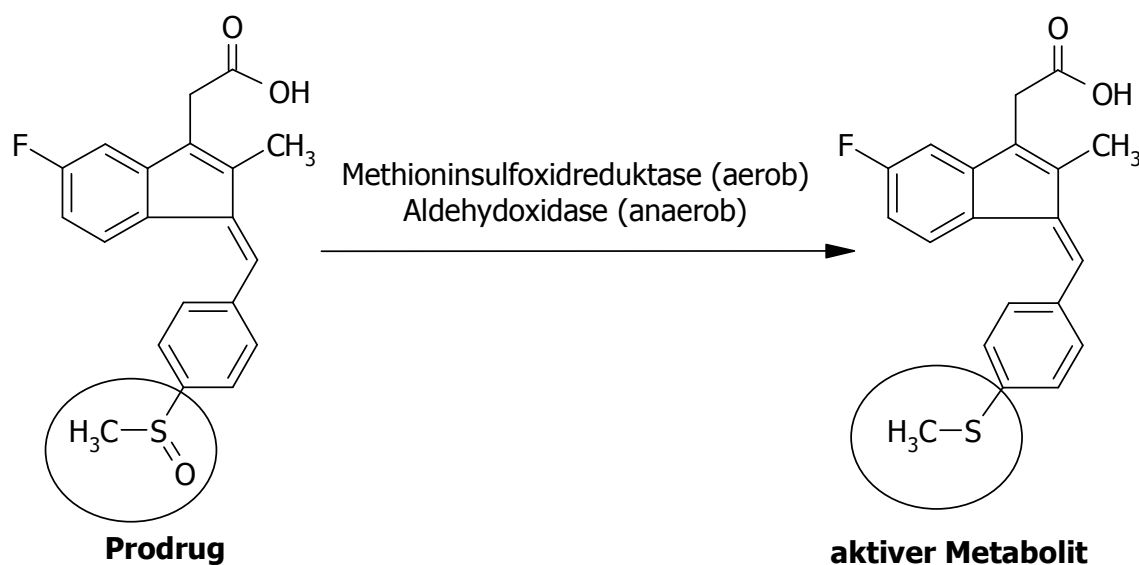


Abb. 1.6 **Bioaktivierung des Prodrugs Sulindac.**

1.4 Biotransformation *N*-hydroxylierter Verbindungen

Molekular gebundene Stickstoffatome unterliegen allgemein den gleichen Biotransformationsprozessen wie Kohlenstoffatome. So können auch an Stickstoffatomen Oxidationen, Reduktionen, Hydrolysen sowie Konjugationsreaktionen ablaufen [Damani, 1982]. Eine wichtige Biotransformationsreaktion ist die *N*-Oxygenierung. Dabei wird ein Sauerstoffatom direkt an den Stickstoff gebunden und bildet somit *N*-hydroxylierte Verbindungen mit primären und sekundären Aminen oder *N*-Oxide mit tertiären Aminen. Diese Oxidationen werden durch Cytochrom P450-Enzyme und Flavinhaltige Monooxygenasen katalysiert [Testa, 1995].

Die oxidative Biotransformation stark basischer, stickstoffhaltiger funktioneller Gruppen konnte erstmals von Clement *et al.* [1983] anhand der *N*-Oxygenierung von Amidinfunktionen nachgewiesen werden. In weiteren Arbeiten konnte auch die enzymatische *N*-Oxygenierung von Isothioharnstoffen [Clement und Wissel, 1991], Guanidinen [Clement und Kunze, 1992] und Amidinohydrazonen [Clement *et al.*, 1996] gezeigt werden.

Die enzymatisch katalysierte Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen ist bereits seit langem bekannt. So konnten Bernheim und Hochstein [1968] erstmals die Reduktion von Hydroxylaminen mit Mitochondrien nachweisen. Das verantwortliche Enzymsystem wurde als membranständig, NADH-abhängig und unempfindlich gegenüber Sauerstoff und Kohlenmonoxid charakterisiert [Bernheim und Hochstein, 1968; Bernheim, 1969].

Kadlubar *et al.* isolierten 1973 eine NADH-Hydroxylaminreduktase aus porcinen Lebermikrosomen, die Gemeinsamkeiten mit dem mitochondrialen Enzym aufwies. Die Enzymreinigung ergab außerdem, dass Cytochrom b_5 und NADH-Cytochrom b_5 -Reduktase an dieser Reduktion beteiligt sind. Durch Zusatz einer dritten Proteinfraction konnte die Aktivität von Cytochrom b_5 und NADH-Cytochrom b_5 -Reduktase gesteigert werden [Kadlubar und Ziegler, 1974]. Das für die Katalyse der Hydroxylaminreduktion ermittelte optimale molare Cytochrom b_5 /NADH-Cytochrom b_5 -Reduktaseverhältnis betrug zehn zu eins.

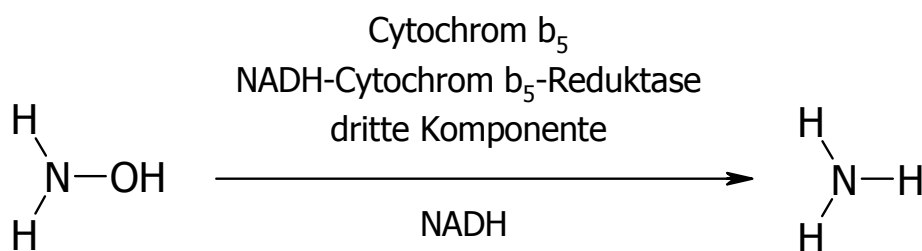


Abb. 1.6 Reduktion von Hydroxylamin [Kadlubar et al., 1973].

Durch *in vitro* Untersuchungen mit Lebermikrosomen und *N*-hydroxylierten Verbindungen konnte eine *N*-reduktive Aktivität für eine Vielzahl dieser Verbindungen gezeigt werden. So werden außer den Hydroxylaminen [Clement *et al.*, 1997; Clement *et al.*, 2000; Clement *et al.*, 2005a] auch *N*-hydroxylierte Amidine [Clement *et al.*, 1988b; Hauptmann *et al.*, 1988; Clement *et al.*, 1993b; Clement und Jung, 1994], Guanidine [Clement *et al.*, 1993a], Amidinohydrazone [Clement *et al.*, 1996; Clement und Demesmaeker, 1997; Clement *et al.*, 2005b] und Oxime [Heberling *et al.*, 2006] durch Mikrosomen reduziert.

Auf der Suche nach dem verantwortlichen mikrosomalen Enzym für die Reduktion der zahlreichen untersuchten Substrate wurde ein Enzym isoliert, das zusammen mit Cytochrom b_5 und NADH-Cytochrom b_5 -Reduktase die Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen katalysiert [Clement *et al.*, 1997]. Die Eigenschaften der mikrosomalen Benzamidoximreduktase (nach dem Modellsubstrat Benzamidoxim benannt) aus Cytochrom b_5 /NADH-Cytochrom b_5 -Reduktase und einer dritten Komponente ähneln denen der Hydroxylaminreduktase. Das gereinigte Enzym konnte mit Hilfe von Sequenzanalysen der CYP2D-Subfamilie der Cytochrom P450-Enzyme zugeordnet werden.

Außer den Mikrosomen zeigten auch andere Zellkompartimente der Leber Benzamidoximreduktaseaktivität. Nachdem Deters [2002] die Reduktion *N*-hydroxylierter Amidine mit porcinen Lebermitochondrien beschrieb, gelangen Havemeyer *et al.* [2006] die Isolierung und Identifizierung der dritten Komponente der mitochondrialen Benzamidoximreduktase als ein Homolog des C-terminalen Teils der Moco-Sulfurase.

Für die *N*-Reduktion im Cytosol wurde die Beteiligung der Aldehyd- und der Xanthinoxidase unter anaeroben Bedingungen beschrieben [Tatsumi und Ishigai,

1987; Clement und Kunze, 1992; Dambrova *et al.*, 1998]. Beide Oxidasen gehören zur Familie der Molybdäncofaktor-abhängigen Enzymen.

Außer in der Leber konnte auch in anderen Geweben und Organen die Reduktion *N*-hydroxylierter Amidine gezeigt werden. So wurde die Reduktion bereits in der Niere und dem Fettgewebe nachgewiesen [Clement und Lopian, 2003; Andersson *et al.*, 2005].

1.5 Biotransformation schwefelhaltiger funktioneller Gruppen

Oxidationsreaktionen scheinen für schwefelhaltige Verbindungen der bevorzugte Biotransformationsweg zu sein. Sie führen im Allgemeinen zu deutlich hydrophileren Sulfoxiden und Sulfonsäurederivaten, die somit leichter ausgeschieden werden können.

Zahlreiche Enzyme aus Bakterien und Pilzen können Sulfidoxidationen katalysieren. Dabei handelt es sich vornehmlich um verschiedene Peroxidasen [Holland, 2001]. Auch im Menschen sind Peroxidase-katalysierte Sulfoxidationen beschrieben worden. So konnte die Oxidation von Thioanisol zum Thioanisolsulfoxid durch die humane Lactoperoxidase *in vitro* gezeigt werden [Tuynman *et al.*, 1998]. Den Hauptanteil an der enzymatischen Schwefeloxidation im Organismus tragen die Monooxygenasen. Speziell die Cytochrom P450-Enzyme der 3A-Familie sind an der Sulfoxidation zahlreicher Substrate beteiligt [Werner *et al.*, 1995; Cashman, 1998]. Daneben sind auch für die Flavinhaltigen Monooxygenasen Beteiligungen an Schwefeloxidationen bekannt [Hamman *et al.*, 2000; Cashman *et al.*, 1992].

Ein bisher wenig beachteter Biotransformationsweg ist die Reduktion von Schwefeloxiden. Eine Ursache dafür könnte sein, dass Sulfoxidreduktionen meist nur unter hypoxischen bzw. anaeroben Bedingungen beschrieben worden sind. Unter diesen Bedingungen ist die Aldehydoxidase eines der hauptverantwortlichen Enzyme dieser Reduktionen [Yoshihara und Tatsumi, 1990].

Die physiologische Relevanz anaerober Reaktionen *in vivo* erscheint jedoch fraglich, wenn man die gute Sauerstoffversorgung insbesondere der metabolisierenden

Organe in Betracht zieht. Die Methioninsulfoxidreduktase ist bis *dato* das einzige Enzym, für das eine sulfoxidreduzierende Aktivität unter aeroben Bedingungen mit hohen Umsatzraten nachgewiesen werden konnte.

1.6 Thema und Zielsetzung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit den Grundlagen enzymatischer Reduktionen. Aufgrund des erfolgreichen Prodrugprinzips der *N*-Hydroxyamidine ist die enzymatische Reduktion dieser Verbindungen von den primären metabolisierenden Organen Leber und Niere bereits eingehend untersucht worden. Auch in anderen Geweben und Organen konnte diese Reduktion, wenn auch in geringerem Ausmaß, nachgewiesen werden.

Ziel dieser Arbeit ist die detaillierte Untersuchung der Reduktion *N*-hydroxylierter Amidine im porcinen Fettgewebe mit Fokus auf die Stearoyl-CoA Desaturase, eines der am stärksten exprimierten Enzyme in diesem Gewebe.

Des Weiteren sind enzymatische Sulfoxidreduktionen mit porcinen Leberpräparationen Bestandteil dieser Arbeit. Diese sind speziell im Hinblick auf eine mögliche Anwendung von Sulfoxidgruppen als Prodrugs von Interesse. Dabei sollte einerseits untersucht werden, inwieweit die Substratspezifität des bereits gut charakterisierten benzamidoximreduzierenden Enzymsystems auf Sulfoxide erweiterbar ist und andererseits ob auch sulfoxidreduzierende Enzyme in der Lage sind, die Reduktion *N*-hydroxylierter Amidine zu katalysieren.

2 **UNTERSUCHUNGEN ZUR REDUKTION VON THIOANISOLSULFOXID**

2.1 **Einleitung**

2.1.1 **Biotransformation thioetherhaltiger funktioneller Gruppen**

Thioether sind Bestandteil zahlreicher körpereigener (z. B. Methionin, Cystathionin) und körperfremder (Arzneistoffe) Verbindungen.

Im Organismus werden Thioether oxidativ metabolisiert, was eine verminderte Lipophilie dieser Verbindungen zur Folge hat. Diese Oxidation kann enzymatisch und nicht enzymatisch (insbesondere bei Methioninresten von Proteinen) katalysiert ablaufen (Abb. 2.1). Die nicht enzymatische Oxidation durch z. B. reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS) wurde insbesondere für die Oxidation schwefelhaltiger Aminosäuren beschrieben (Kap. 3.1).

An der enzymatischen Oxidation sind vor allem Cytochrom P450-Enzyme (P450) und flavinhaltige Monooxygenasen (FMO) beteiligt [Waxman *et al.*, 1982; Werner *et al.*, 1995; Nnane *et al.*, 2001]. Thioether können über das Sulfoxid bis zum Sulfon oxidiert werden. Während das Sulfon enzymatisch nicht mehr zum Sulfoxid oder Sulfid reduziert werden kann, wird die Reduktion des Sulfoxids enzymatisch durch Sulfoxidreduktasen katalysiert (Abb. 2.1) [Felsted *et al.*, 1973; Brot *et al.*, 1981; Tatsumi *et al.*, 1983; Moskovitz *et al.*, 1996].

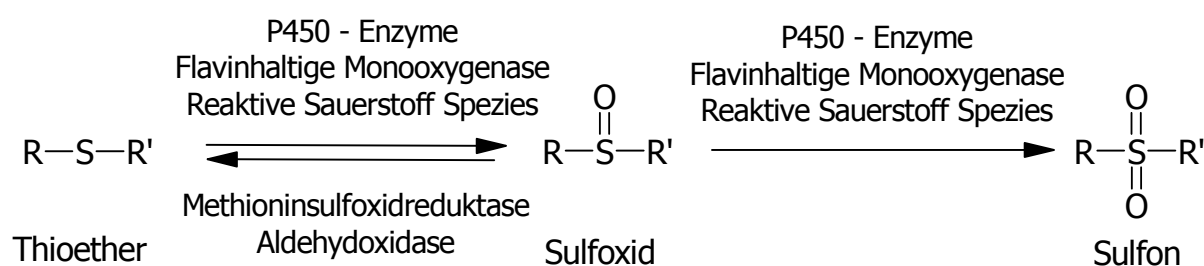


Abb. 2.1 Schema der Biotransformation von Thioethern.

Neben den humanen sind auch bakterielle Sulfoxidreduktasen bekannt. In *E. coli*, einer hauptsächlich im menschlichen Verdauungstrakt vorkommenden Bakterie, sind mehrere sulfoxidreduzierende Enzyme identifiziert worden [Lee und Renwick, 1995]. Diese Enzyme (in Bakterien des humanen Gastrointestinaltraktes) sind zu einem nicht unerheblichen Anteil an der Biotransformation von Sulfoxiden beteiligt.

Im Menschen wurden vor allem zwei in ihren Eigenschaften sehr verschiedene sulfoxidreduzierende Enzyme eingehend untersucht. Das sind zum einen die Methioninsulfoxidreduktase (Kap. 3) und zum anderen die Aldehydoxidase (Tab. 2.1).

	<i>Methioninsulfoxidreduktase</i>	<i>Aldehydoxidase</i>
<i>Sauerstoffbedingungen</i>	Aerob	Anaerob
<i>Coenzyme</i>	NADPH Thioredoxin/Thioredoxin- reduktase (<i>in vivo</i>), DTT (<i>in vitro</i>)	Hydroxypyrimidin Benzaldehyd Acetaldehyd
<i>Subzelluläre Lokalisation</i>	Zytosol Mitochondrien Mikrosomen	Zytosol Mitochondrien
<i>Substrate</i>	Methylsulfoxide	Sulfoxide
	Brot <i>et al.</i> , 1981 Moskovitz <i>et al.</i> , 1996	Felsted <i>et al.</i> , 1973 Tatsumi <i>et al.</i> , 1983

Tab. 2.1 Vergleichende Darstellung humaner sulfoxidreduzierender Enzyme.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen beiden Enzymen sind die für die Reaktion benötigten Sauerstoffbedingungen. Während die Aldehydoxidase nur unter anaeroben Bedingungen Sulfoxide reduziert, ist die Methioninsulfoxidreduktase auch in Gegenwart von Sauerstoff dazu in der Lage. Unterschiede zeigen sich auch bei der Substratspezifität beider Enzyme. Vor allem für die Thioredoxin/Thioredoxin-reduktaseabhängige Sulfoxidreduktase konnte gezeigt werden, dass Thioether

zwischen zwei großen Resten offensichtlich sterisch abgeschirmt werden, so dass diese zwar noch oxidiert aber praktisch nicht mehr reduziert werden. Bereits die Erweiterung der Methylsulfoxid-Gruppe um eine CH₂-Gruppen zeigte eine drastische Verminderung der Reduktaseaktivität [Fukazawa *et al.*, 1987]. Auch *in vivo* Untersuchungen mit Diphenylsulfoxid (DPSO) in der Ratte ergaben, dass Thioether umgeben von großen Resten hauptsächlich oxidativ metabolisiert werden, während die Reduktion dieser Sulfoxide erschwert wird [Mitchell *et al.*, 2000]. Für Methylsulfoxidgruppen hingegen konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine relevante Reduktion belegt werden.

2.1.2 Molybdoenzyme und Sulfoxidreduktionen

Die Aldehydoxidase ist ein Molybdoenzym, welches die Bildung von Karbonsäuren aus Aldehyden katalysiert [Rajagopalan *et al.*, 1962]. Sie ist aber auch an Reduktionen beteiligt. So wurden Aldehydoxidase-katalysierte Reduktionen von Stickstoff- und Schwefeloxiden beschrieben [Tatsumi *et al.*, 1983; Kitamura *et al.*, 2006]. Für die katalytische Aktivität der Aldehydoxidase ist ein terminaler Schwefel essentiell, der von einem weiteren Enzym, der Moco-Sulfurase (HMCS) übertragen wird. Der genaue Aktivierungsmechanismus ist noch nicht geklärt [Mendel und Bittner, 2006].

Für den C-terminalen Teil der Moco-Sulfurase (HMCS-CT) konnte eine Beteiligung an der Reduktion von *N*-hydroxylierten Amidinen nachgewiesen werden. In porcinen Mitochondrien aus der Leber und der Niere wurde mARC (mitochondrial Benzamidoxime Reducing Component), welcher homolog mit dem C-terminalen Teil der Moco-Sulfurase ist, als verantwortliches Enzym für die Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen identifiziert [Havemeyer *et al.*, 2006; Holtkamp, 2007]. Die Reduktion von Sulfoxiden durch den C-terminalen Teil der Moco-Sulfurase ist bisher noch nicht untersucht worden.

2.1.3 Thema und Zielsetzung

Die Reduktion zahlreicher *N*-hydroxylierter Verbindungen durch mikrosomale, mitochondriale und zytosolische NADH-abhängige Enzyme ist bereits beschrieben worden [Tatsumi und Ishigai, 1987; Cribb *et al.*, 1995; Clement *et al.*, 1997; Dambrova *et al.*, 1998; Clement *et al.*, 2005a]. So konnte für die aus Schweinelebermikrosomen gereinigte Benzamidoximreduktase im rekonstituierten System die Beteiligung an der Reduktion von Amidoximen [Clement *et al.*, 1997; Clement und Lopian, 2003] *N*-hydroxylierten Amidinohydrazonen [Clement *et al.*, 1997] und Hydroxylaminderivaten [Clement *et al.*, 1997; Clement *et al.*, 2000; Clement *et al.*, 2005a] gezeigt werden. Auch die gereinigten mitochondrialen Präparationen reduzieren eine Vielzahl *N*-hydroxylierter Verbindungen [Deters, 2002; Andersson *et al.*, 2005; Clement *et al.*, 2005b]. Diese Variabilität der von der Benzamidoximreduktase akzeptierten Verbindungen führte zu der Fragestellung, ob dieses Enzym auch zur Reduktion anderer funktioneller Gruppen wie den Sulfoxiden in der Lage ist. Dies ist insbesondere in Hinblick auf die mögliche Verwendung von Sulfoxidfunktionen als Prodrug von Interesse.

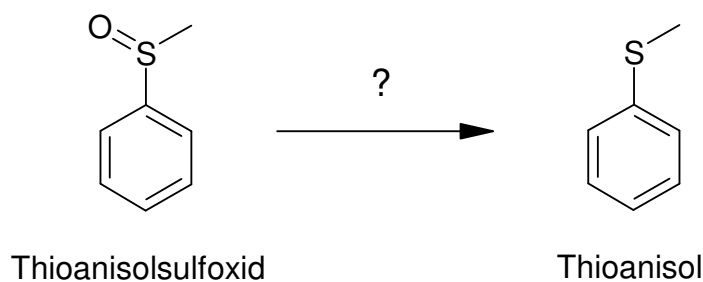


Abb. 2.2 Reduktion des Modellsubstrates Thioanisolsulfoxid zum Thioanisol.

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der gereinigten, porcinen Leberpräparationen auf Sulfoxidreduktaseaktivität. Thioanisolsulfoxid wurde als Modellsubstrat gewählt (Abb. 2.2). Untersucht werden sollte die Thioanisolsulfoxidreduktion mit Mikrosomen und der daraus gereinigten Benzamidoximreduktase sowie mit Mitochondrien, der daraus gewonnenen äußeren Membranfraktion und der mitochondrialen benzamidoximreduzierenden Komponente (mARC), einem Bestandteil der mitochondrialen Benzamidoximreduktase. Außerdem sollte das Zytosol in die Untersuchungen mit

einbezogen werden, da besonders für diese Fraktion Sulfoxidreduktaseaktivität beschrieben wurde [Fukazawa *et al.*, 1987; Tatsumi *et al.*, 1982]. Dazu sollten die verschiedenen Enzymquellen mit Thioanisolsulfoxid in Gegenwart der Cosubstrate NADH, NADPH oder DTT inkubiert und zur Quantifizierung des resultierenden Metaboliten Thioanisol eine geeignete HPLC-Analytik entwickelt werden.

2.2 Methoden

2.2.1 Materialien und Geräte

Alle verwendeten Materialien und Geräte sind in Kapitel 8 dieser Arbeit aufgeführt.

2.2.2 Gewinnung porciner Lebermitochondrien

Die Schweinelebern wurden vom örtlichen Schlachthof bezogen. Unmittelbar nach der Tötung und dem Ausbluten des Tieres wurde die Leber entnommen und in eisgekühltem Standardpuffer (0,25 M Saccharose, 1 mM EDTA, 10 mM KH_2PO_4 , 1 mM DTT, 0,1% BSA, pH 7,4) bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt. Pro Reinigung wurden 2 bis 3 Lebern verwendet. Alle Arbeitsschritte wurden bei 4°C mit eisgekühlten Puffern durchgeführt. Die Leber wurde mit Standardpuffer perfundiert, in kleine Stücke geschnitten und mehrmals gewaschen. Anschließend zerkleinerte ein Fleischwolf die Stücke zum Rohhomogenat, welches mit Standardpuffer im Verhältnis 1:1 verdünnt im Durchflusshomogenisator homogenisiert wurde. Zur Abtrennung von Zelltrümmern und -kernen wurde fünfmal für 15 min bei 600g zentrifugiert und das jeweilige Pellet verworfen. Zur Abtrennung der Mikrosomen wurde der Überstand durch Verbandmull kolliert und 20 min bei 10300g zentrifugiert. Der 10300g-Überstand wurde, wie in Kap. 2.2.2 beschrieben, für die Gewinnung von Mikrosomen weiterverwendet.

Das erhaltene Pellet wurde in Standardpuffer resuspendiert und mittels Dichtegradientenzentrifugation weiter aufgereinigt [Clement *et al.*, 2005b]. Die Mitochondrien wurden anschließend aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.2.3 Gereinigte Enzympräparationen aus Mitochondrien

Die in dieser Arbeit untersuchte aufgereinigte äußere Membranfraktion aus Mitochondrien wurde nach der Methode von Clement *et al.* [2005b] isoliert und freundlicherweise von A. Havemeyer zur Verfügung gestellt.

2.2.4 C-Terminus der Moco-Sulfurase

Die rekombinante C-terminale Domäne der humanen Moco-Sulfurase (HMCS-CT), die in verschiedenen *E. coli* Stämmen exprimiert wurde, stellte Dr. Bittner (Technische Universität Braunschweig) zur Verfügung.

2.2.5 Gewinnung von Zytosol und Mikrosomen aus porciner Leber

Die Isolierung der Lebermikrosomen erfolgte durch differentielle Ultrazentrifugation in Anlehnung an Clement *et al.* [1996]. Der in Kap. 2.2.2 beschriebene 10300g - Überstand wurde 70 min bei 200000g zentrifugiert. Einige Aliquots des Überstandes (Zytosol) wurden bei -80°C gelagert. Das Pellet wurde resuspendiert und erneut 70 min bei 200000g zentrifugiert. Aliquots der letzten Pelletresuspension (Mikrosomen) wurden bei -80°C gelagert.

2.2.6 Gewinnung der Komponenten des Benzamidoxim-reduktasesystems aus Lebermikrosomen

2.2.6.1 Cytochrom b₅ (Cyt b₅)

In Anlehnung an die Methode von Taniguchi *et al.* [1984] wurde die in Kap. 2.2.3 beschriebene Mikrosomensuspension solubilisiert und mittels Hydrophober Interaktionschromatographie (HIC) an Octyl-Sepharose und Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose weiter aufgereinigt. Anschließend wurde die Cyt b₅-Fraktion mit Hilfe einer Sephadex[®] G-100 Säule umgepuffert und nach Detergenzienentfernung bei -80°C gelagert.

2.2.6.2 NADH-Cyt b₅-Reduktase

NADH-Cyt b₅-Reduktase wurde in Anlehnung an die Methode von Clement *et al.* [1997] und Karhan [2002] isoliert. Danach wurde die mittels der HIC gewonnene Cyt b₅-Reduktase-haltige Fraktion durch Bioaffinitätschromatographie an einer

5'-AMP-Sepharose-Säule aufgereinigt und nach Detergenzienentfernung bei -80°C gelagert.

2.2.6.3 Mikrosomale Benzamidoximreduktase

Die Benzamidoximreduktase wurde nach Clement *et al.* [1997] isoliert. Die Trennung der Benzamidoximreduktase von der Cyt b₅-Reduktase, die zusammen in einer Fraktion der HIC eluiert wurden, erfolgte mittels präparativer HPLC. Nach der Detergenzienentfernung wurden Aliquots bei -80°C gelagert.

2.2.7 Analytik der Enzymcharakterisierung

2.2.7.1 Proteingehalt

Der Proteingehalt wurde nach Smith *et al.* [1985] mit der Bicinchoninsäure (BCA)-Methode bestimmt. Das Reagenzien-Kitt der Fa. Pierce (Rockford, USA) enthielt eine Lösung aus Natriumcarbonat, Natriumhydrogencarbonat, 2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure, Natriumtartrat und Kupfersulfat in 0,2 M Natronlauge. 900 µl dieses Reagenzes wurden zu 100 µl Probelösungen in verschiedenen Konzentrationen gegeben und 20 min bei 60°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Die kolorimetrische Messung bei 562 nm gegen einen Blindwert erfolgte innerhalb von 3 min nach dem Abstoppen der Reaktion mit Eiswasser. Parallel zur Gehaltsbestimmung wurde eine Fünf-Punkt-Kalibrierung anhand des im Kitt enthaltenen Rinderserumalbumin-Standards durchgeführt.

2.2.7.2 Cyt b₅-Gehalt

Differenzspektren der reduzierten und der oxidierten Form des Cyt b₅ wurden nach einem Verfahren von Estabrook und Werringloer [1978] zur Gehaltsbestimmung des Cyt b₅ verwendet.

2.2.7.3 NADH-Cyt b₅-Reduktaseaktivität

Für die Bestimmung der NADH-Cyt b₅-Reduktaseaktivität wurde in Anlehnung an Mihara und Sato [1978] die Reduktion von Kaliumhexacyanoferrat(III) bei 420 nm spektralphotometrisch gemessen.

2.2.7.4 Cytochrom P450-Gehalt

Der Gehalt an Cytochrom P450 wurde nach einer Methode von Omura und Sato [1964] über das Differenzspektrum des reduzierten Cytochrom P450 und des reduzierten Cytochrom P450-CO-Komplexes ermittelt. Nach der Zugabe von Natriumdithionit zur Probenlösung, welches das darin enthaltene Cytochrom P450 reduzierte, wurde ein Absorptionsspektrum zwischen 400-500 nm aufgenommen. Die Probenlösung wurde dann für 30 s mit Kohlenmonoxid begast und erneut spektralphotometrisch vermessen. Aus beiden Spektren wurde ein Differenzspektrum erstellt und mit Hilfe der Differenz der Absorptionen bei 450 und 490 nm und des Absorptionskoeffizienten des reduzierten Cytochrom P450-CO-Komplexes von $91 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ der Gehalt an Cytochrom P450 in der Probe bestimmt.

2.2.8 *In vitro* Biotransformation

Falls nicht abweichend beschrieben, wurden alle Inkubationen in 1,5 ml Reaktionsgefäßen unter aeroben Bedingungen im Schüttelwasserbad bei 37°C inkubiert. Nach 3-minütiger Vorinkubation mit Protein und Thioanisolsulfoxid wurde die Reaktion durch Zugabe des Cosubstrates gestartet und nach 20 min mit eisgekühltem Acetonitril abgestoppt. Nach 2 min Schütteln wurden die Inkubationsansätze 5 min bei 10000 U/min zentrifugiert und der Überstand in HPLC-Vials zur Analyse überführt. Alle Inkubationen wurden am selben Tag vermessen.

2.2.8.1 Inkubationsansatz mit Mikrosomen, Mitochondrien und Zytosol

Ein Inkubationsansatz mit Mikrosomen, Mitochondrien oder Zytosol enthielt 0,9 mg Protein, 2,0 mM Thioanisolsulfoxid, 0,5 mM NADH oder NADPH bzw. 15 mM DTT in 100 µl 20 mM Tris-HCl mit einem pH-Wert von 7,4.

2.2.8.2 Inkubationsansatz mit dem rekonstituierten System

Inkubationen mit dem rekonstituierten System enthielten 50 pmol Cyt b₅, 0,2 U NADH-Cyt b₅-Reduktase und 3,3 µg Benzamidoximreduktase, 25 µM DLPC, 2,0 mM Thioanisolsulfoxid, 0,5 mM NADH oder NADPH bzw. 15 mM DTT in 100 µl 20 mM Tris-HCl mit einem pH-Wert von 7,4.

2.2.9 HPLC-Analytik

Eine HPLC-Methode zur Trennung von Thioanisol und Thioanisolsulfoxid wurde im Rahmen dieser Arbeit entwickelt. Die mobile Phase wurde durch einen Membranfilter (45 µm) der Fa. Sartorius® filtriert und im Ultraschallbad 15 min entgast. Die Analytik wurde mit folgendem System durchgeführt:

HPLC Pumpe:	Waters 510 HPLC-Pump
Autosampler:	WISP 710B Autosampler
Detektor:	Waters 486 Turnable Absorbance Detector
Degasser:	Erc-3512 Degasser, Erma (Tokyo)
Interface:	Waters System Interface Module
Software:	Maxima 820
Stationäre Phase:	LiChroCART® 250-4 HPLC-Kartusche mit LiChrospher® 60 RP-select B (5 µm), Vorsäule RP-select B, 4 x 4 mm (Merck, Darmstadt)
Mobile Phase:	Methanol/ <i>Aqua bidest</i> 65:35 (v/v)
Flussrate:	1,0 ml/min
Laufzeit:	11 min
Detektion:	UV, 245 nm
Injektionsvolumen:	30 µl

Zur Kalibrierung wurde ein doppelter Ansatz fünf verschiedener Konzentrationen (1-20 µM) Thioanisol je zweimal vermessen. Die Kalibriergerade war in dem ermittelten Konzentrationsbereich linear ($r^2=0,999$). Thioanisolsulfoxid wurde nach $4,00 \pm 0,05$ min und Thioanisol nach $9,23 \pm 0,05$ min eluiert.

Die Wiederfindungsrate wurde ermittelt, indem die für die Kalibrierung verwendeten Konzentrationen Thioanisol den Inkubationsansätzen zugesetzt wurden, wobei das Protein vor der Inkubation für 15 min auf 100°C erhitzt und auf die Zugabe von Cosubstrat verzichtet wurde. Alle weiteren Arbeitsschritte verliefen wie in Kap. 2.2.8 und 2.2.8.1 beschrieben. Die Wiederfindungsrate betrug $114\% \pm 12$.

2.3 Ergebnisse

2.3.1 Optimierung der Thioanisolsulfoxidreduktion

Zur Optimierung der NADH-abhängigen mikrosomalen Sulfoxidreduktion wurde der Einfluss der Proteinkonzentration, der Inkubationszeit, des pH-Wertes und der Art des verwendeten Puffers untersucht. Die Ergebnisse sind in den Abb. 2.3-5 dargestellt.

Die Inkubationen des Thioanisolsulfoxids in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration der eingesetzten Schweinelebermikrosomen ergaben im Bereich von 0,3 bis 1,1 mg/ml einen linearen Kurvenverlauf der Umsetzungsraten gegen die Proteinkonzentration. Höhere Proteinkonzentrationen führten bereits zur Hemmung der Umsetzungsraten (Abb. 2.3).

Die Reduktion in Abhängigkeit von der Inkubationszeit verlief bis 20 min annähernd linear. Bei längerer Inkubationszeit zeigte sich eine Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit (Abb. 2.4).

Die Thioanisolsulfoxidreduktion weist im untersuchten pH-Bereich zwei Maxima auf. Das erste liegt bei pH 6 in Tris-HCl- bzw. 6,5 in Phosphatpuffer und das zweite bei pH 7,4 unabhängig vom verwendeten Puffersystem. In Gegenwart von Tris-HCl-Puffer war die Umsetzung nahezu im gesamten untersuchten pH-Bereich effektiver als mit Phosphatpuffer (Abb. 2.5).

Aus den ermittelten Ergebnissen ergab sich der folgende optimierte Inkubationsansatz (Kap. 2.2.8.1): 0,9 mg Protein, 2,0 mM Thioanisolsulfoxid, 0,5 mM NADH in 100 µl 20 mM Tris-HCl mit einem pH-Wert von 7,4.

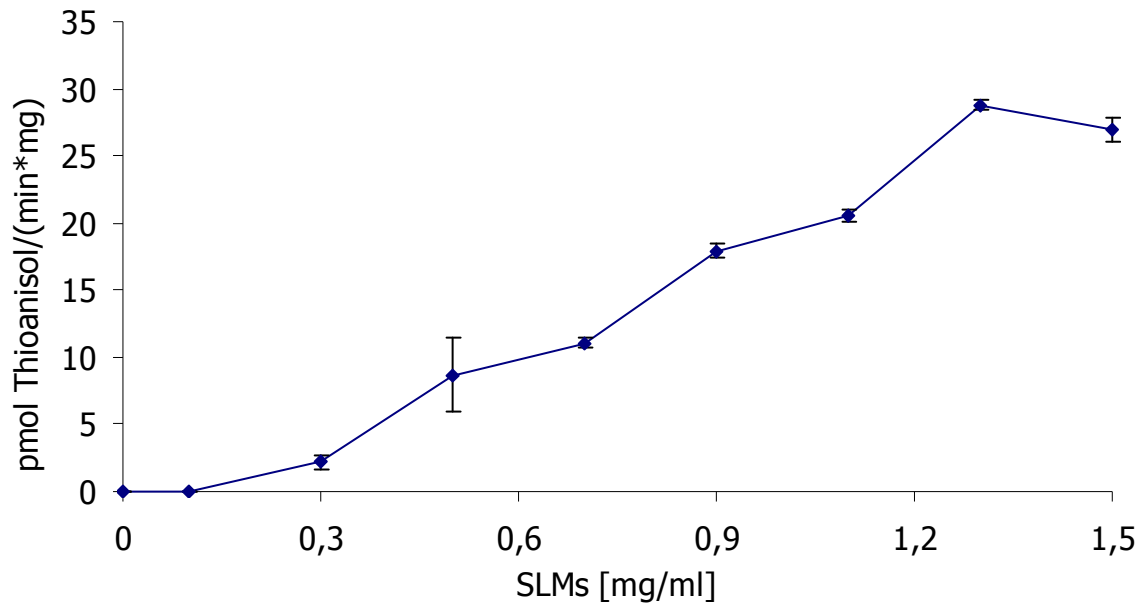


Abb. 2.3 Proteinabhängigkeit der Reduktion von Thioanisolsulfoxid zu Thioanisol.

Die Inkubationsansätze enthielten: 0-1,5 mg/ml Protein, 0,5 mM NADH und 2 mM Thioanisolsulfoxid in 50 mM Tris-HCl-Puffer bei pH 7,4. Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten. Durchführung und Aufarbeitung der Reaktionsansätze sind in Kap. 2.2.8 beschrieben. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

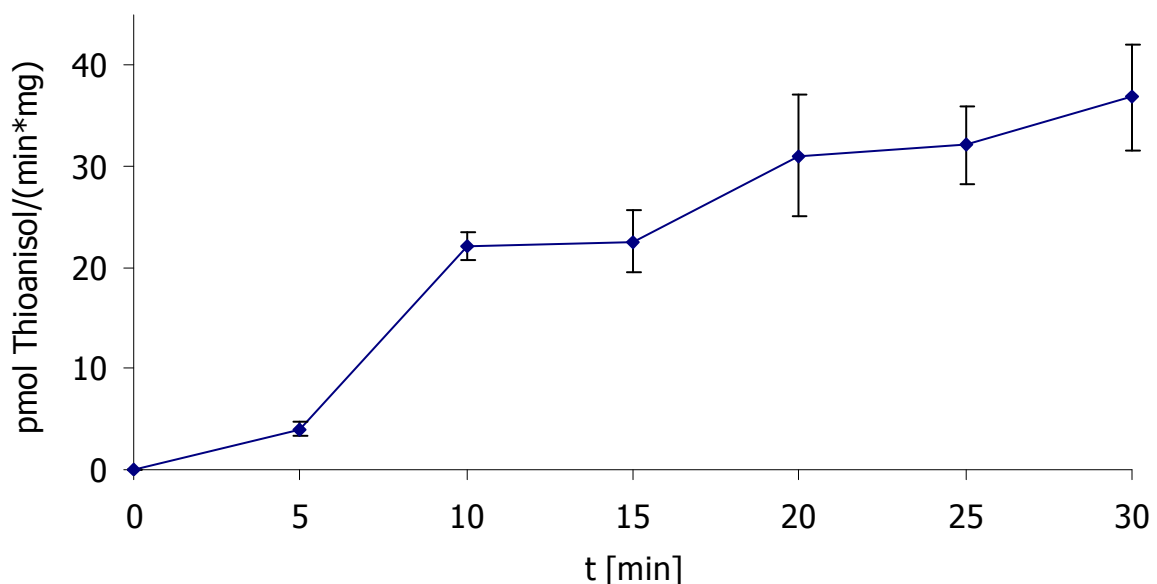


Abb. 2.4 Zeitabhängigkeit der Reduktion von Thioanisolsulfoxid zu Thioanisol.

Die Inkubationsansätze enthielten: 0,9 mg/ml Protein, 0,5 mM NADH und 2 mM Thioanisolsulfoxid in 50 mM Tris-HCl-Puffer bei pH 7,4. Die Inkubationszeit betrug 0-30 Minuten. Die Durchführung und Aufarbeitung der Reaktionsansätze sind in Kap. 2.2.8 beschrieben. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, welche jeweils doppelt vermessen wurden.

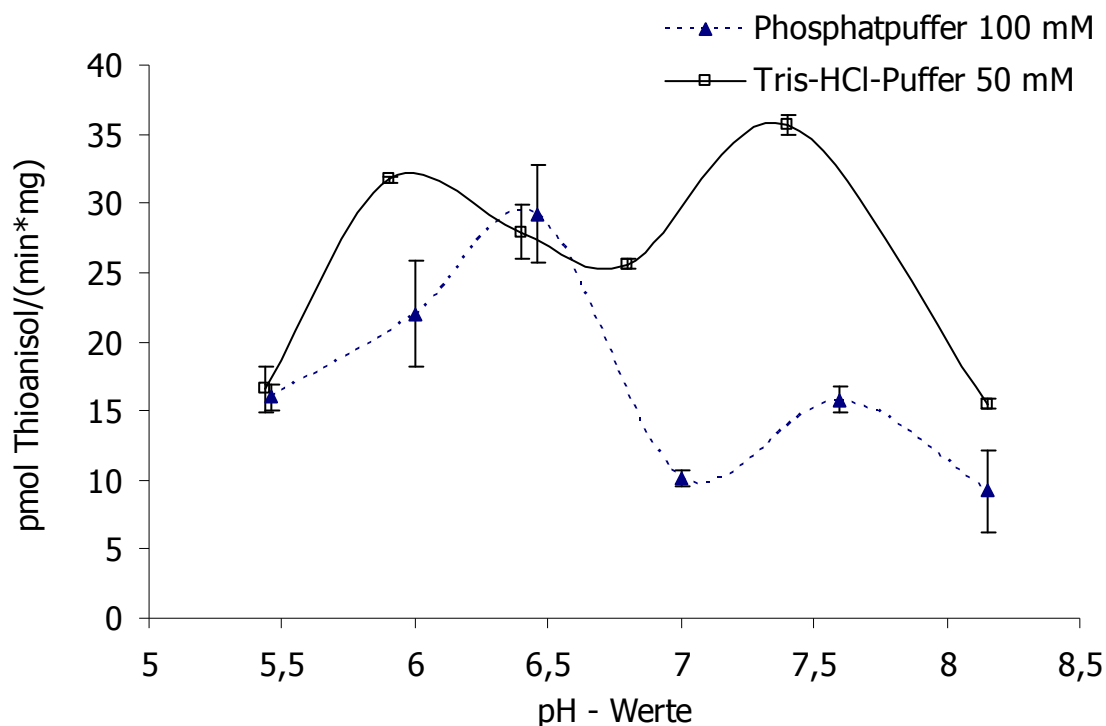


Abb. 2.5 pH-Wert-abhängigkeit der Reduktion von Thioanisolsulfoxid zu Thioanisol.

Die Inkubationsansätze enthielten: 0,9 mg/ml Protein, 0,5 mM NADH und 2 mM Thioanisolsulfoxid in 100 mM Phosphatpuffer bzw. 50 mM Tris-HCl-Puffer bei pH-Werten zwischen 5,5 und 8,5. Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten. Durchführung und Aufarbeitung der Reaktionsansätze sind in Kap. 2.2.8 beschrieben. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, welche jeweils doppelt vermessen wurden.

2.3.2 Reduktion mit Mikrosomen

Die porcinen Lebermikrosomen reduzieren Thioanisolsulfoxid. Die Inkubationsansätze mit NADH und NADPH unterscheiden sich nicht signifikant in ihren Umsetzungsraten. DTT als alleiniges Cosubstrat bewirkt im Vergleich zur NAD(P)H-abhängigen Reduktion eine deutliche Steigerung der Aktivität. Bei Zusatz von NADPH und DTT ist eine leichte Abnahme der Aktivität verglichen mit DTT als alleinigem Cosubstrat zu verzeichnen. Während NADH und DTT diesbezüglich eine leichte Aktivitätssteigerung bewirken (Abb. 2.6).

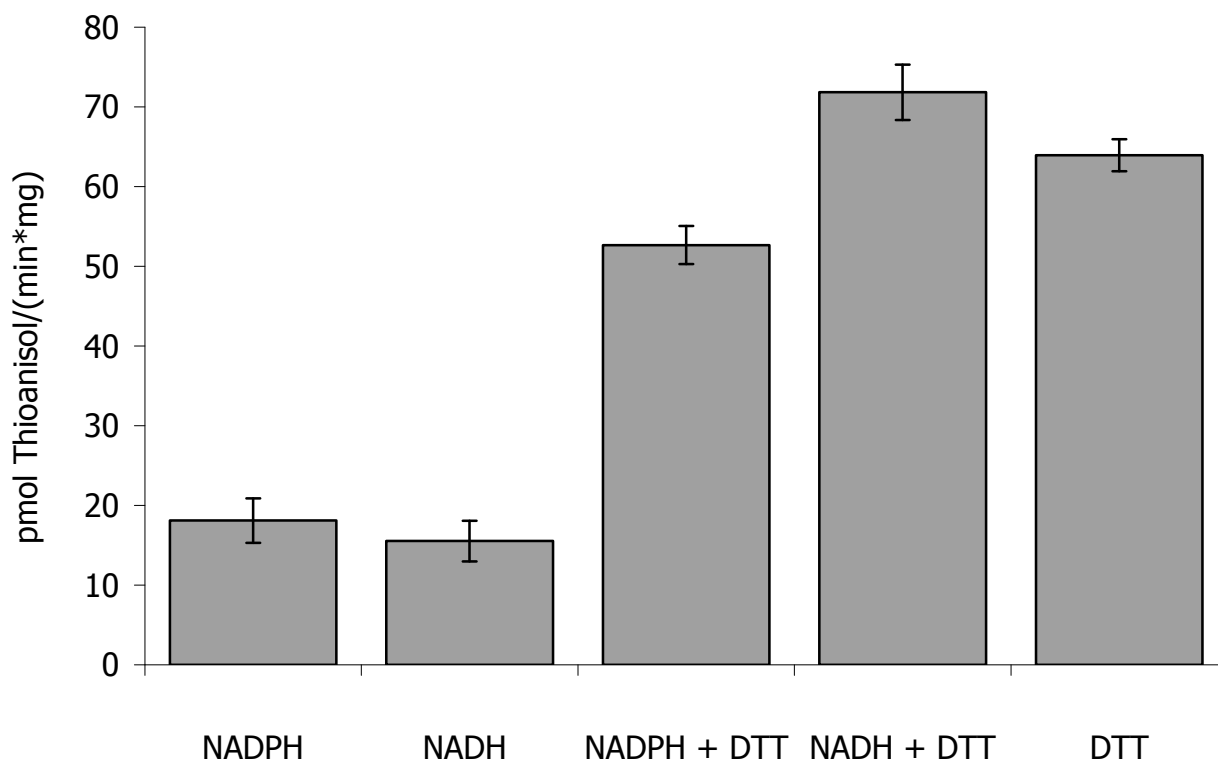


Abb. 2.6 Reduktion von Thioanisolsulfoxid mit porcinen Lebermikrosomen.

Die Inkubationsansätze enthielten: 0,9 mg/ml Protein, 0,5 mM NADH bzw. NADPH, 15 mM DTT und 2 mM Thioanisolsulfoxid in 50 mM Tris-HCl-Puffer bei pH 7,4. Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten. Durchführung und Aufarbeitung der Reaktionsansätze sind in Kap. 2.2.8 beschrieben. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, welche jeweils doppelt vermessen wurden.

2.3.3 Reduktion mit dem mikrosomalen rekonstituierten System

Die Inkubationen mit dem rekonstituierten System wurden wie in Kap. 2.2.8.2 beschrieben durchgeführt. Die Konzentration des Metaboliten Thioanisol lag unterhalb der Bestimmungsgrenze von 1 μM .

2.3.4 Reduktion mit Mitochondrien

Die porcinen Lebermitochondrien reduzieren Thioanisolsulfoxid. Die Umsatzrate NADH abhängigen Reduktion beträgt ca. ein viertel der NADPH-abhängigen Umsetzung. Mit DTT als alleinigem Cosubstrat sind die höchsten Umsatzraten zu verzeichnen. Der Zusatz von NADPH bzw. NADH zum Inkubationsansatz mit DTT bewirkt eine leichte Abnahme der Aktivität verglichen zur Umsatzrate mit DTT als alleinigem Cosubstrat (Abb. 2.7).

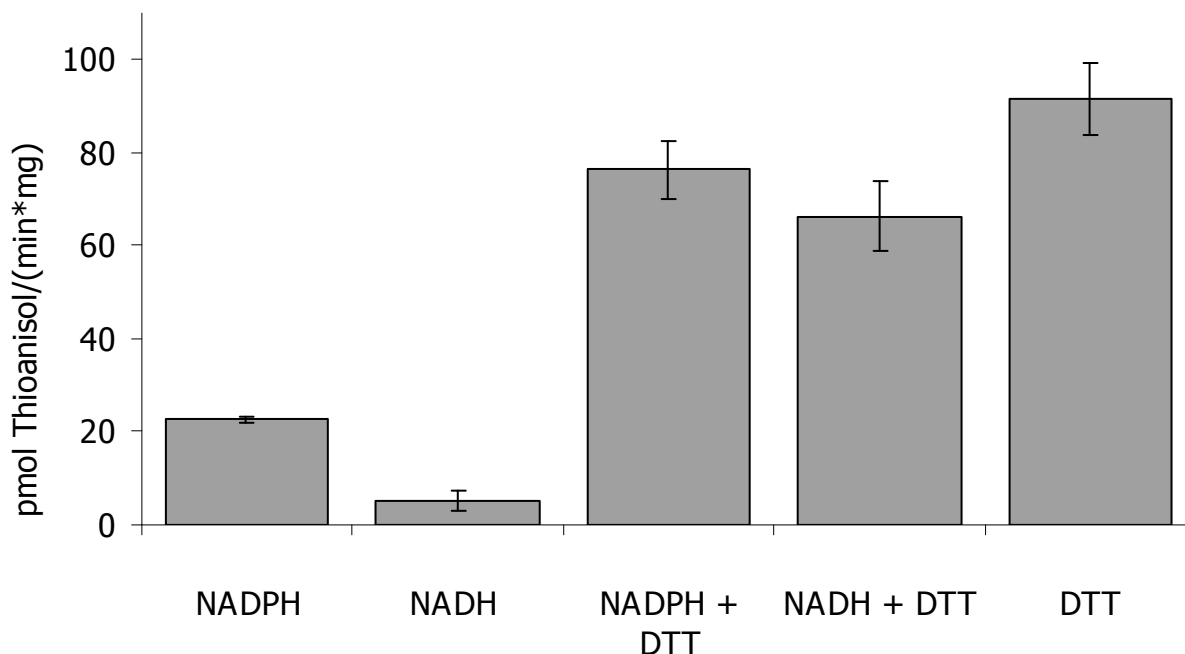


Abb. 2.7 Reduktion von Thioanisolsulfoxid mit porcinen Lebermitochondrien.

Die Inkubationsansätze enthielten: 0,9 mg/ml Protein, 0,5 mM NADH bzw. NADPH, 15 mM DTT und 2 mM Thioanisolsulfoxid in 50 mM Tris-HCl-Puffer bei pH 7,4. Die Durchführung und Aufarbeitung der Reaktionsansätze sind in Kap. 2.2.8 beschrieben. Die ermittelten Umsatzraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, welche jeweils doppelt vermessen wurden.

2.3.5 Reduktion mit der äußeren mitochondrialen Membran (OMV)

Die Inkubationen mit der äußeren mitochondrialen Membran wurden wie in Kap. 2.2.8 beschrieben durchgeführt. Abweichend vom beschriebenen Inkubationsansatz (Kap. 2.2.8.2) wurde aufgrund der hohen Benzamidoximreduktaseaktivität der OMV [Clement *et al.*, 2005b] nur 0,3 mg/ml Protein verwendet.

Die Inkubationen mit der gereinigten äußeren mitochondrialen Membran zeigten keine quantifizierbare Sulfoxidreduktaseaktivität.

2.3.6 Reduktion mit dem mitochondrialen rekonstituierten System

Der rekombinante humane C-Terminus der Moco-Sulfurase wurde im rekonstituierten System mit Cyt b₅ und NADH-Cyt b₅-Reduktase inkubiert (Kap. 2.2.8.2)

Die Inkubationen mit dem mitochondrialen rekonstituierten System zeigten keine Umsetzung des Thioanisolsulfoxids zum Thioanisol.

2.3.7 Reduktion mit Zytosol

Das Zytosol aus der porcinen Leber reduziert Thioanisolsulfoxid. Verglichen mit der NADPH-abhängigen Reduktion weist die NADH-abhängige Reduktion geringere Umsetzungsraten auf. Mit DTT als alleinigem Cosubstrat sind mit dem Zytosol die höchsten Umsetzungsraten zu verzeichnen. Der Zusatz von NADPH bzw. NADH zum Inkubationsansatz mit DTT hat keinen Einfluss auf die Aktivität des Zytosol. (Abb. 2.8).

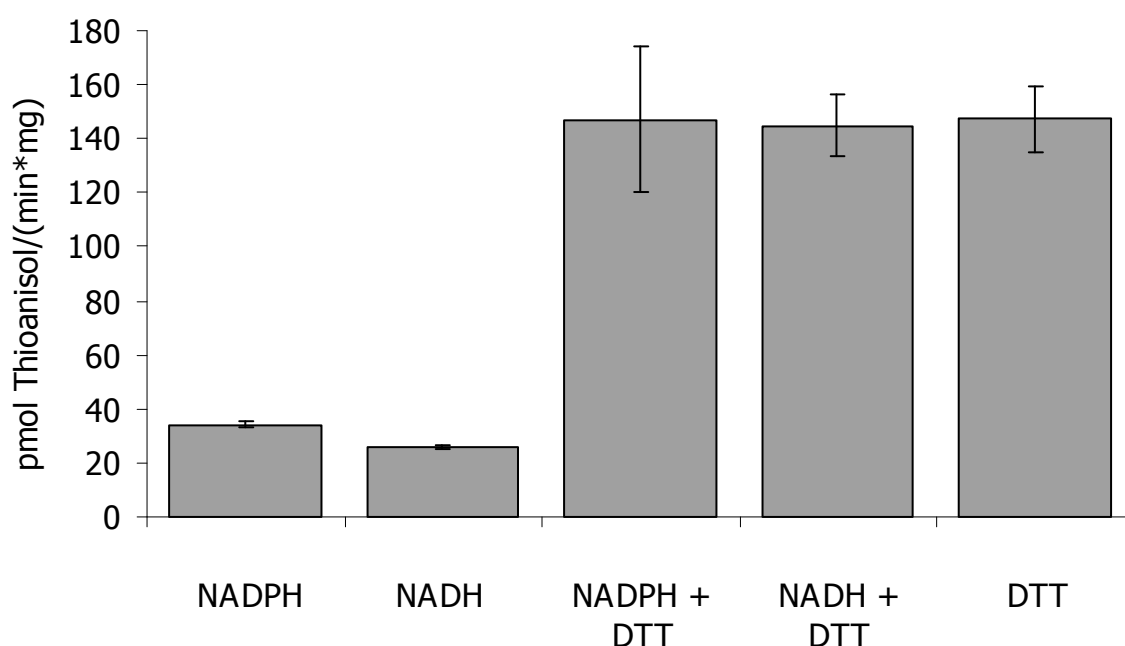


Abb. 2.8 Reduktion von Thioanisolsulfoxid mit porcinem Leberzytosol.

Die Inkubationsansätze enthielten: 0,9 mg/ml Protein, 0,5 mM NADH bzw. NADPH, 15 mM DTT und 2 mM Thioanisolsulfoxid in 50 mM Tris-HCl-Puffer bei pH 7,4. Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten. Durchführung und Aufarbeitung der Reaktionsansätze sind in Kap. 2.2.8 beschrieben. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, welche jeweils doppelt vermessen wurden.

2.3.8 Vergleich der DTT-abhängigen Thioanisolsulfoxidreduktion

Die DTT-abhängige Sulfoxidreduktaseaktivität in porciner Leber weist intrazelluläre Unterschiede auf. Allgemein ist die Aktivität im Zytosol am höchsten, gefolgt von Mitochondrien und Mikrosomen (Abb. 2.9).

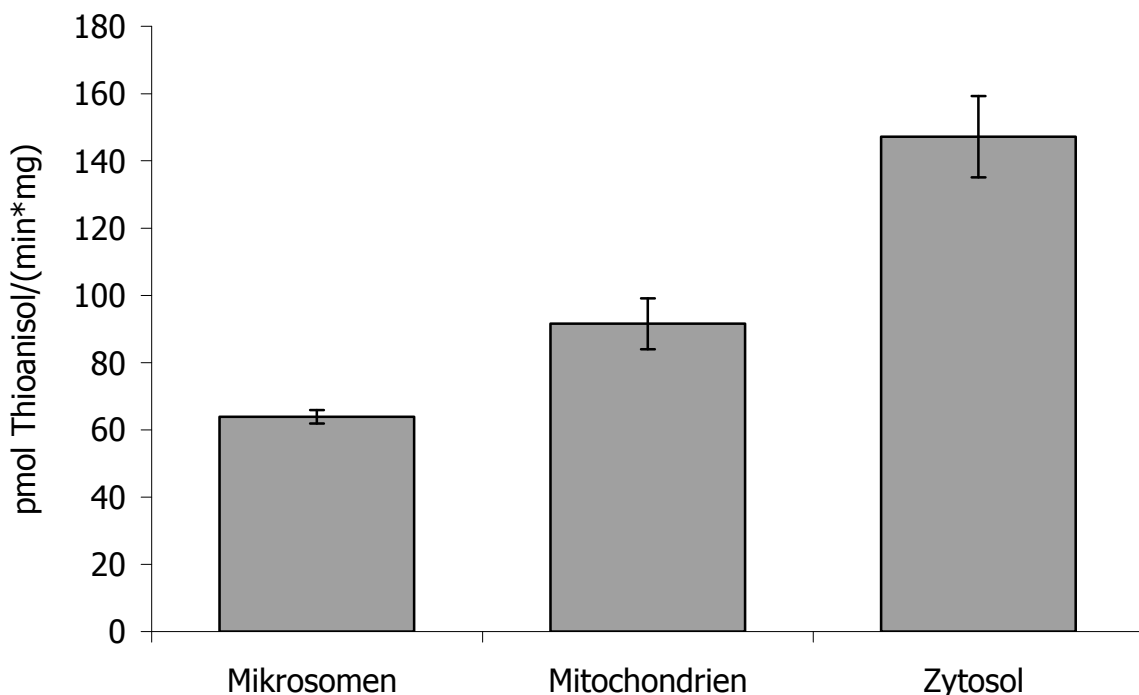


Abb. 2.9 Vergleich der DTT-abhängigen Thioanisolsulfoxidreduktion verschiedener Zellkompartimente.

Die Inkubationsansätze setzten sich wie folgt zusammen: 0,9 mg/ml Protein, 0,5 mM NADH bzw. NADPH, 15 mM DTT und 2 mM Thioanisolsulfoxid in 50 mM Tris-HCl-Puffer bei pH 7,4. Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten. Durchführung und Aufarbeitung der Reaktionsansätze sind in Kap. 2.2.8 beschrieben. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, welche jeweils doppelt vermessen wurden.

2.3.9 Reduktion von Thioanisolsulfoxid mit rekombinanter humaner Methioninsulfoxidreduktase (hMsrA)

Die hMsrA katalysiert die Reduktion des Thioanisolsulfoxids *in vitro* mit einer Umsatzrate von 189 ± 1 nmol Thioanisol/(min*mg) (Abb. 2.10). Die Kontrollinkubationen mit denaturiertem Protein und ohne Zusatz von DTT als Cosubstrat belegen den enzymatischen Charakter dieser Reduktion.

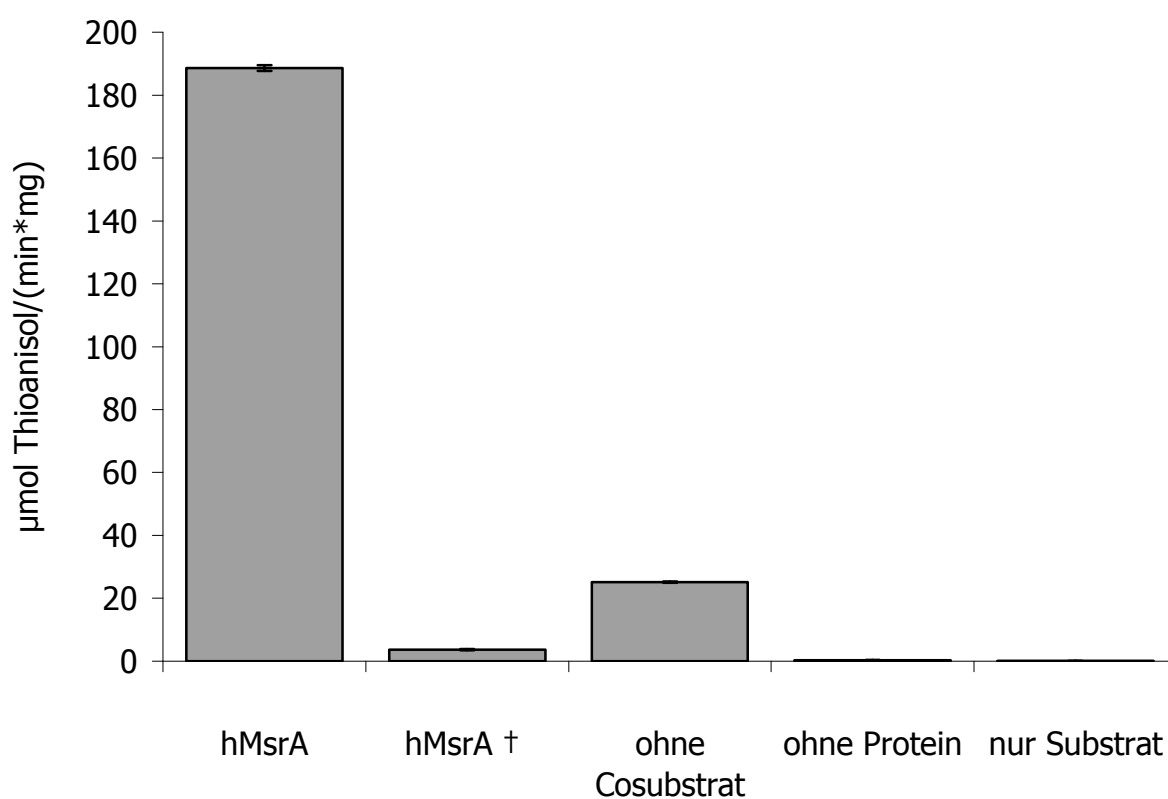


Abb. 2.10 In vitro Reduktion von Thioanisolsulfoxid mit hMsrA.

Die Inkubationsansätze enthielten 5 μg hMsrA, 2 mM Substrat (Thioanisolsulfoxid) und 15 mM Cosubstrat (DTT). Die durchgeführten Kontrollinkubationen enthielten: 5 μg für 15 min auf 95°C erhitzte hMsrA †, den Komplettansatz ohne Cosubstrat oder ohne Enzymzusatz sowie Substrat allein. Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten. Durchführung und Aufarbeitung der Reaktionsansätze sind in Kap. 2.2.8 beschrieben. Die ermittelten Umsatzraten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus mindestens zwei Inkubationsansätzen, die je zweimal analysiert wurden.

2.4 Diskussion

Die Ergebnisse der Inkubationen verschiedener porciner Leberzellkompartimente mit Thioanisolsulfoxid belegen eindeutig eine Sulfoxidreduktion unter aeroben Bedingungen (Abb. 2.11). Dabei sind die Umsatzraten in allen Kompartimenten unter Zusatz von DTT, welches *in vitro* das Thioredoxin/Thioredoxinreduktase-System ersetzt, deutlich höher als in Gegenwart von NADH bzw. NADPH. Die Umsatzraten weisen kompartimentspezifische Unterschiede auf. So nimmt die sulfoxidreduktive Aktivität unabhängig vom zugesetzten Cosubstrat, mit Ausnahme der NADH-abhängigen Reduktion in Mitochondrien, in der Reihenfolge Mikrosomen, Mitochondrien, Zytosol zu.

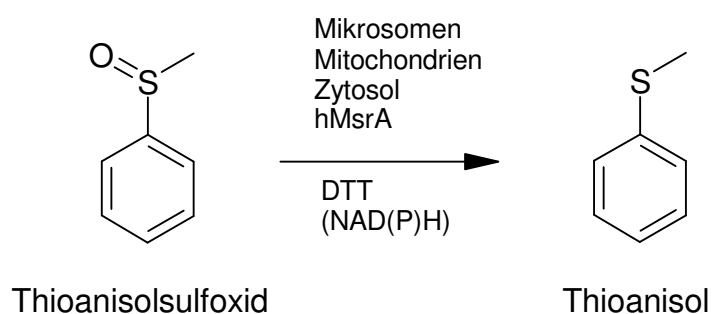


Abb. 2.11 Reduktion des Modellsubstrates Thioanisolsulfoxid zum Thioanisol.

Die verhältnismäßig geringen Umsatzraten in Mikrosomen, aber auch in Mitochondrien, sind höchstwahrscheinlich auf die in diesen Kompartimenten verstärkt ablaufenden *S*-Oxidationsreaktionen zurückzuführen [Duescher *et al.*, 1994; Lee und Renwick, 1995; Elfarrar und Krause, 2005]. Auffallend ist in diesem Zusammenhang die schwache Umsatzrate mit NADH in Mitochondrien. Offensichtlich scheinen hier Oxidations- und Reduktionsreaktion nahezu im Gleichgewicht zu liegen. Im Zytosol ist der Unterschied der Umsatzraten der DTT-abhängigen Reduktion zur NADH-abhängigen am stärksten ausgeprägt. Im Vergleich zu den Reduktionsraten mit NADH und NADPH beträgt die Umsatzrate ca. das Fünffache.

Die Inkubationsansätze mit der OMV, einer wichtigen Zwischenstufe bei der

Gewinnung der mitochondrialen Benzamidoximreduktase [Havemeyer *et al.*, 2006], ergaben keinerlei Aktivität mit den verwendeten Cosubstraten. Somit konnte keine Korrelation der Thioanisolsulfoxidreduktaseaktivität zu der durch die Reinigung erreichten Anreicherung der Benzamidoximreduktaseaktivität gezeigt werden. Sowohl für die mikrosomale als auch für die mitochondriale Benzamidoximreduktase konnte eine Thioanisolsulfoxidreduktaseaktivität in Gegenwart der untersuchten Cosubstrate NADH, NADPH und DTT ausgeschlossen werden.

Die Tatsachen, dass in den porcinen Lebermikrosomen, -mitochondrien und -zytosol DTT dem NADH bzw. NADPH als Cosubstrat deutlich überlegen ist, die Reduktion unter aeroben Bedingungen katalysiert wird und DTT zudem als ein Hemmstoff der Aldehydoxidase beschrieben wurde [Yoshihara und Tatsumi 1985], sprechen für die Thioredoxin/Thioredoxinreduktase-abhängige Methioninsulfoxidreduktase als verantwortliches Enzym für die beobachtete aerobe Reduktion des Thioanisolsulfoxids in porciner Leber. Die *in vitro* Untersuchungen der hMsrA-katalysierten Thioanisolsulfoxidreduktion konnten die hohe katalytische Effizienz dieses Enzym für diese Substanzklasse belegen.

Diese Ergebnisse bestätigen die Präsenz eines Enzyms in porciner Leber, welches die Aktivierung von Prodrugs mit Methylsulfoxidgruppe katalysieren kann. Die Prodrugaktivierung durch ein Enzym, das nicht zur Familie der Cytochrom P450 Enzyme gehört ist von Vorteil, da dann das häufig als problematisch anzusehende Interaktionspotential mit Cytochrom P450 Enzymen bei diesen Verbindungen kaum eine Rolle spielt.

2.5 Zusammenfassung

Mit den untersuchten porcinen Leberzellkompartimenten konnte erstmalig *in vitro* eine DTT-abhängige Sulfoxidreduktaseaktivität im Schwein gezeigt werden. Auch in Gegenwart von NADH bzw. NADPH wurde diese Reduktion katalysiert, wenngleich die Umsetzungsraten mit diesen Cosubstraten nur ein Fünftel im Vergleich zur DTT-enthaltenden Inkubation betrugen.

Die Aktivität der Thioanisolsulfoxidreduktion wies kompartimentspezifische Unterschiede auf. Ausgehend von der höchsten Aktivität im Zytosol nahm diese über Mitochondrien zu den Mikrosomen hin ab. Diese Ergebnisse deuten auf die Methioninsulfoxidreduktase als das für diese Reduktion hauptverantwortliche Enzym in der Schweineleber hin. Untersuchungen mit der humanen Methioninsulfoxidreduktase (hMsrA) belegten die hohe katalytische Effizienz dieses Enzyms für die Reduktion von Methylsulfoxidgruppen.

Eine Beteiligung der Benzamidoximreduktase aus porcinen Mikrosomen und Mitochondrien an der aeroben Reduktion des Thioanisolsulfoxids zum Thioanisol konnte ausgeschlossen werden.

Dennoch ist die Präsenz eines sulfoxidreduzierenden Enzyms in den porcinen Leberpräparationen für die Aktivierung von Prodrugs mit Methylsulfoxidgruppen von Bedeutung.

3 **UNTERSUCHUNGEN MIT DER METHIONINSULFOXID-REDUKTASE**

3.1 **Einleitung**

3.1.1 **Humane Methioninsulfoxidreduktase (hMsr)**

Die essentielle Aminosäure Methionin ist Bestandteil zahlreicher Proteine. Unter physiologischen Bedingungen wird aufgrund der schwachen Nukleophilie der Seitenkette, sowohl proteingebundenes als auch freies Methionin relativ leicht durch eine Vielzahl an Reaktionen, wie z. B. metall-katalysierte Oxidationen umgesetzt [Vogt, 1995; Dufield *et al.*, 2004]. Auch die enzymatische Oxidation des Methionins durch FMOs (Flavinhaltige Monooxygenasen) ist beschrieben worden [Duescher *et al.*, 1994; Krause *et al.*, 1996; Ripp *et al.*, 1999; Hoshi und Heinemann, 2001]. Durch die Oxidation des Methionins am Schwefelatom entstehen das Methionin-*R*-sulfoxid und das Methionin-*S*-sulfoxid (Abb. 3.1) [Vogt, 1995; Sharov *et al.*, 1999].

Die Oxidation des Methionins über das Methioninsulfoxid bis hin zum Methioninsulfon erfolgt im Organismus auch durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Methioninsulfon ist enzymatisch nicht mehr reduzierbar und hat anscheinend keine biologische Aktivität. Die Stereoisomere des Methioninsulfoxids können stereospezifisch von der jeweiligen Isoform der Methioninsulfoxidreduktase MsrA und MsrB reduziert werden.

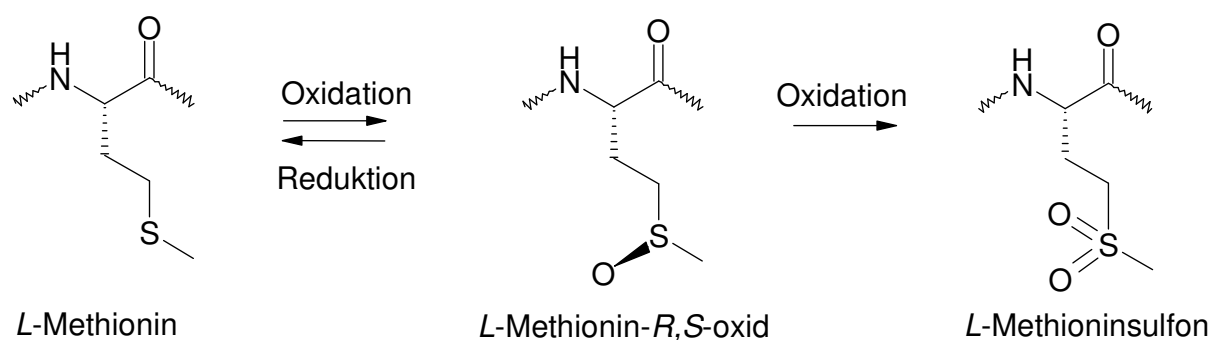


Abb. 3.1 Redoxreaktionen des gebundenen Methionins.

Das Methioninsulfoxon kann jedoch enzymatisch nicht mehr reduziert werden und hat offensichtlich keine weitere physiologische Bedeutung (Abb. 3.1) [Brot und Weissbach, 1983; 2000].

Die Einführung eines Sauerstoffatoms in die Seitenkette des Methionins führt zu einer erhöhten Polarität und einer verminderten Beweglichkeit [Vogt, 1995]. In Proteinen kann die Oxidation von oberflächenexponierten Methioninresten eine drastische Steigerung der Oberflächenhydrophobizität des Proteins und damit eine erhöhte Sensibilität gegen proteolytischen Abbau verursachen [Chao *et al.*, 1997]. Außerdem kann ein erhöhter Oxidationsstatus in Proteinen Konformations- [Hsu *et al.*, 1996; Sigalov und Stern, 1998; 2001] und Aktivitätsänderungen bewirken [Vogt, 1995; Hsu *et al.*, 1996].

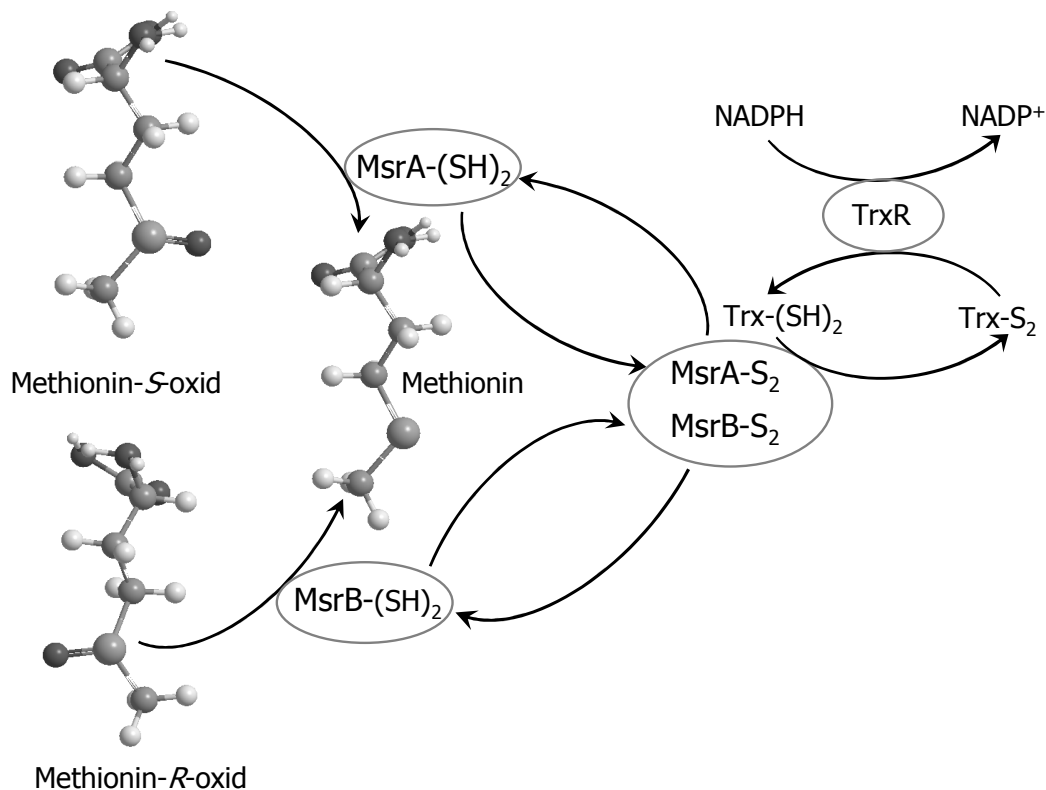


Abb. 3.2 Funktionsweise der Methioninsulfoxidreduktasen.

Die reduzierte Form der MsrA (MsrA-(SH)_2) ist die aktive Form, welche das Substrat Methioninsulfoxid (Met-S-O) binden und zum Methionin reduzieren kann. Die MsrA wird dabei oxidiert zur (MsrA-S_2). Reduziertes Thioredoxin (Trx-(SH)_2) wandelt die MsrA wieder in ihren aktiven, reduzierten Zustand um, wobei es selbst oxidiert wird (Trx-S_2). Unter NADPH-Verbrauch reduziert die Thioredoxinreduktase (TrxR) das oxidierte Thioredoxin (Trx-S_2) in seine reduzierte Ausgangsform (Trx-(SH)_2). (modifiziert nach Hansel *et al.*, [2007])

Methioninsulfoxidreduktasen katalysieren die Reduktion von freiem und gebundenem Methioninsulfoxid mit Hilfe des Thioredoxin/Thioredoxinreduktase-Systems [Stadman *et al.*, 2002]. Für das chemisch stabilere Methioninsulfon hingegen ist kein reduzierendes Enzym bekannt [Unnikrishnan und Rao, 1990]. Die beiden Diastereomere des Methioninsulfoxids werden von zwei verschiedenen Enzymklassen katalysiert. Die hMsrA reduziert exklusiv das *S*-Enantiomer [Sharov *et al.*, 1999], während die hMsrB die Reduktion des *R*-Enantiomers katalysiert (Abb. 3.2) [Kim und Gladyshev, 2004]. Nur beide Enzyme zusammen können oxidativ beschädigte Proteine vollständig reparieren [Bar-Noy und Moskovitz, 2002]. Trotz der Stereoselektivität der Methioninsulfoxidreduktasen weisen diese eine breite Substratspezifität für methylsulfoxidhaltige funktionelle Gruppen auf. Eine Beteiligung insbesondere der hMsrA an der Reduktion von *S*-Methyl-*p*-Toluolsulfoxid [Moskovitz *et al.*, 2000], Sulforaphane [Weissbach *et al.*, 2005], Sulindac [Etienne *et al.*, 2003] und anderen ist bereits beschrieben worden.

Die Methioninsulfoxidreduktasen sind ubiquitär vorkommende Enzyme, welche hauptsächlich in den Mitochondrien und im Zytosol, aber auch im Endoplasmatischen Retikulum fast aller humanen Organe nachgewiesen wurden. Während im Menschen bislang nur ein hMsrA-Gen entdeckt wurde [Moskovitz *et al.*, 1996; Kuschel *et al.*, 1999], sind drei hMsrB-Gene (hMsrB1, hMsrB2, hSEL-MsrB) bekannt [Huang *et al.*, 1999; Bar-Noy und Moskovitz, 2002; Kim und Gladyshev, 2004]. Hinsichtlich der Expressionsrate der mRNA sind deutliche Unterschiede zwischen beiden Enzymklassen hMsrA und hMsrB und deren Isoformen zu verzeichnen.

Die intrazelluläre MsrA-Lokalisation scheint sich am jeweiligen Bedarf zu orientieren. So konnte eine Signalfrequenz an Säuger-MsrA identifiziert werden, die den Transport des Enzyms aus dem Zytosol in die Mitochondrien signalisiert [Hansel *et al.*, 2002]. Da in den Mitochondrien, den „Kraftwerken“ der Zelle, ca. 1-4% des in der Atmungskette metabolisierten Sauerstoff zu Sauerstoffradikalen umgewandelt werden [Kowaltowski und Vercesi, 1999; Finkel und Holbrook, 2000], ist hier eine hohe MsrA-Expression physiologisch sinnvoll.

<i>Untergruppe</i>	<i>Subzelluläre Lokalisation</i>	<i>Gewebsspezifische Lokalisation*</i>
<i>hMsrA</i>	Mitochondrien, Zytosol	Gehirn, Niere, Leber, Herz
hMsrB1	Mitochondrien	Herz, Skelettmuskel, Leber, Niere
<i>hMsrB</i>	Mitochondrien, Endoplasmatisches Retikulum	Glatte Muskulatur
SEL-MsrB	Zytoplasma, Nukleus	?

Tab. 3.1 Lokalisation der humanen Methioninsulfoxidreduktase.

Die subzelluläre Lokalisation der hMsrA wurde durch Massenspektroskopie gekoppelte subzelluläre Fraktionierung von Rattenleber ermittelt [Vougier et al., 2003], während die der hMsrB mittels Fluoreszenzmikroskopie markierter Msr-Proteine bestimmt wurde [Kim und Gladyshev, 2004]. Durch Quantifizierung der mRNA der jeweiligen Msr-Form in verschiedenen Geweben wurde die Verteilung der Unterformen im humanen Gewebe ermittelt.

hMsrA: [Kuschel et al., 1999; Moskovitz et al., 1996]

hMsrB: [Jung et al., 2002]

* geordnet nach abnehmender mRNA-Expression

Aber auch im glatten Endoplasmatischen Retikulum können z. B. durch, Cytochrom P450- und Cytochrom b₅-katalysierte Reaktionen Sauerstoffradikale entstehen [Aust et al., 1972; Halliwell und Cross, 1994]. Eine Isoform der hMsrB wurde in diesem Kompartiment identifiziert [Jung et al., 2002], so dass anzunehmen ist, dass es auch eine mikrosomale hMsrA gibt. Eine andere diskutierte Möglichkeit ist das Vorkommen von Epimerasen, die die Sulfoxidfunktionen in das jeweilige Epimer umwandeln können [Kim und Gladyshev, 2004].

3.1.1.1 Thioredoxin/Thioredoxinreduktase

Thioredoxin ist ein kleines (106 Aminosäuren), saures, hitzestabiles Protein mit zwei reaktionsfähigen Thiolgruppen, die in der oxidierten Form eine Disulfidbrücke bilden. Unter Verwendung von NADPH kann das Flavoprotein Thioredoxinreduktase das oxidierte Thioredoxin wieder in seine reduzierte Form überführen [Karlson *et al.*, 1994]. Das Elektronentransfersystem aus Thioredoxin und Thioredoxinreduktase ist ubiquitär in nahezu allen Organismen zu finden. Intrazellulär sind bislang eine zytoplasmatische und eine mitochondriale Isoform bekannt [Spyrou *et al.*, 1997; Miranda-Vizuete *et al.*, 1999]. Eine der Hauptfunktionen des Thioredoxin/Thioredoxinreduktase-Systems ist die Aufrechterhaltung des reduzierten Status von Cysteinresten intrazellulärer Proteine [Holmgren, 1985; 1995].

3.1.1.2 Mechanismus der hMsrA-katalysierten Reaktion

Der Reaktionsmechanismus der hMsrA unterscheidet sich von dem der hMsrB [Jung, 2005]. Durch verschiedene Untersuchungen konnten die für die MsrA-Aktivität essentiellen Cysteinreste bestimmt werden [Lowther *et al.*, 2000a; Moskovitz *et al.*, 2000; Boschi-Muller *et al.*, 2000].

Für den Mechanismus der Reduktion des Methioninsulfoxids durch die bovine MsrA, deren Sequenzhomologie zur humanen bei 88% liegt, schlugen Lowther *et al.* [2000b] eine Kette von Thiol/Disulfid-Austauschschritten vor, bei der insgesamt zwei Protonen und zwei Elektronen übertragen werden. Der Cysteinrest 72 im aktiven Zentrum der MsrA wird aktiviert und bildet ein Thiolatanion. Dieses bildet durch einen nukleophilen Angriff auf das Schwefelatom des Methioninsulfoxids, der möglicherweise durch einen simultan ablaufenden Protonentransfer vom Glutaminsäurerest 115 unterstützt wird, eine tetravalente Disulfid-S-oxidzwischenstufe. Durch Ausbildung einer Disulfidbrücke mit dem benachbarten Cysteinrest 218 erfolgt ein Protonentransfer auf das Sauerstoffatom des Sulfoxids und begünstigt somit unter Wasserabspaltung den Zerfall der Zwischenstufe zum Methionin. Der reduzierte Status wird erst durch einen Thiol-Disulfid-Austausch über den Cysteinrest 227 und die Reaktion mit dem Cosubstrat (DTT oder Thioredoxin) wieder hergestellt.

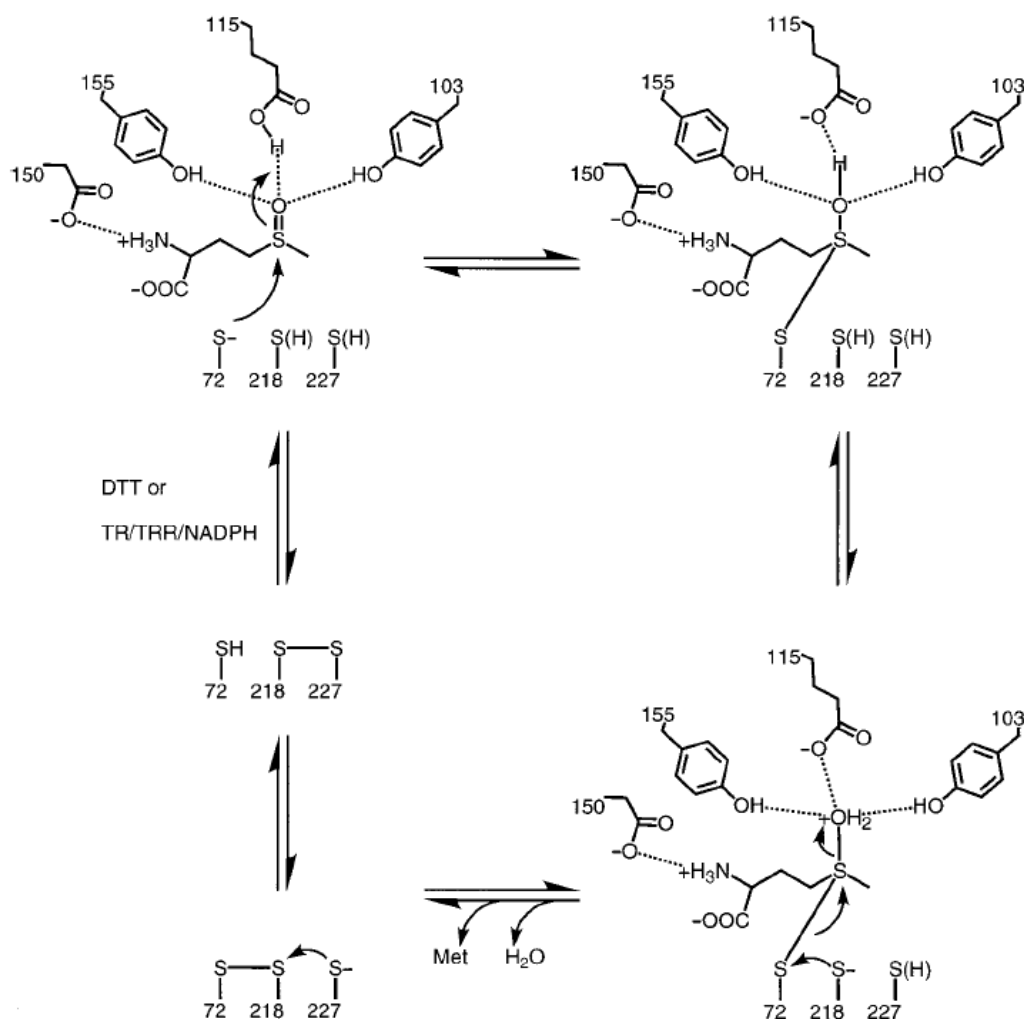


Abb. 3.3 Postulierter Reaktionsmechanismus für bovine MsrA nach Lowther et al. [2000b].

Die für die Reaktion wichtigen Proteinreste im aktiven Zentrum wurden dargestellt, um mögliche Interaktionen sowohl bei der Substratbindung, -aktivierung und -stabilisierung als auch bei der Abspaltung der kovalenten Zwischenstufe zu veranschaulichen. Durch einen nukleophilen Angriff des Cysteinrests 72 auf das Schwefelatom des Methioninsulfoxids entsteht bei simultanem Protonentransfer eine kovalent gebundene Zwischenstufe. Über einen Thiol-Disulfidaustausch mit einem benachbarten Cysteinrest und einem weiteren Protonentransfer kommt es unter Wasserabspaltung zum Zerfall der Zwischenstufe und zur Bildung des Methionins. Das Thioredoxin/Thioredoxinreduktase-System (TR/TRR) in vivo und DTT in vitro stellen dann den reduzierten Status des aktiven Zentrums der bMsrA über Thiol-Disulfidaustauschschritte wieder her.

3.1.1.3 Biologische Bedeutung

Die genaue Bedeutung der Methioninsulfoxidreduktasen im Menschen ist noch nicht geklärt. Es gibt aber verschiedene Hypothesen über die Funktion dieser Enzymfamilie. Allgemein anerkannt ist die Funktion der Methioninsulfoxidreduktase als Reparaturprotein für oxidativ geschädigte Proteine [Levine *et al.*, 1999; Stadtman *et al.*, 2003]. In einem Versuch mit MsrA-Knockout-Mäusen zeigten diese aufgrund der erhöhten Anfälligkeit gegen oxidativen Stress verstärkt neuronale Schäden und eine um 40% verringerte Lebensspanne [Moskovitz *et al.*, 2001]. Eine Überexprimierung von bMsrA in Fruchtfliegen hingegen konnte deren Lebensspanne nahezu verdoppeln [Ruan *et al.*, 2002]. Die Oxidation von Methioninresten wird mit vielen Krankheitsbildern in Verbindung gebracht (z. B. neurodegenerative Erkrankungen, Emphyseme und Rheumatoide Arthritis). Außerdem wurde eine Abnahme der MsrA-Aktivität bei Alzheimerpatienten beobachtet [Gabbita *et al.*, 1999]. Durch UV-Strahlung oxidierte Proteine in der Haut können durch hMsrA und hMsrB, die beide in der Epidermis vorhanden sind, repariert werden [Ogawa *et al.*, 2006; Schallreuter, 2006].

Nach einer weiteren Hypothese könnte die Methioninsulfoxidreduktase als Auffangmechanismus für Sauerstoffradikale in der Zelle fungieren [Brot und Weissbach, 2000; Levine *et al.*, 2000]. Die leicht oxidierbaren Methioninreste werden von den reaktiven Sauerstoffradikalen zu weniger reaktiven Methioninsulfoxidresten oxidiert, die dann wiederum von der Methioninsulfoxidreduktase unter NADPH-Verbrauch zu Methionin reduziert werden, welches somit wieder zur Reaktion mit einem Sauerstoffradikal zur Verfügung steht. Durch diesen Kreislauf kann der reduzierte Status wichtiger Zellproteine aufrechterhalten werden. Auch an Signaltransduktionsprozessen und der Regulation von Zellfunktionen wird eine Beteiligung dieses Zyklus diskutiert [Sun *et al.*, 1999; Finkel, 2000].

Eine weitere hypothetische Funktion ist die Regulierung der Lebensspanne. In mehreren Arbeiten konnte ein Zusammenhang zwischen der Methioninsulfoxidreduktase-Expression und der Lebensspanne hergestellt werden. So konnten Petropoulos *et al.* [2001] eine altersabhängige Abnahme der MsrA-Aktivität in Rattenleber, -hirn und -niere nachweisen. Picot *et al.* [2004] fand eine Abnahme der Genexpression der MsrA und MsrB in alternden, humanen Fibroblasten (WI32) und damit verbunden eine Zunahme an oxidierten Proteinen sowie eine veränderte

enzymatische Aktivität. Die Überexpression von MsrA in Fibroblasten konnte diese vor oxidativem Stress schützen [Picot *et al.*, 2005]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die verminderte Expression von MsrA und B in alternden Zellen deren Fähigkeit zur Reduktion oxidativer Schäden einschränkt und somit an der mehrfach beobachteten altersabhängigen Zunahme an oxidierten Proteinen und den daraus resultierenden Folgen bis hin zum Zelltod, beteiligt ist.

3.1.2 Thema und Zielsetzung

Da die MsrA ein ubiquitär vorkommendes Enzym ist, welches einerseits in hohen Maßen in den metabolisierenden Organen Leber und Niere exprimiert wird [Kuschel *et al.*, 1999; Moskovitz *et al.*, 1996] und andererseits eine breite Substratspezifität gegenüber Methylsulfoxiden aufweist [Moskovitz *et al.*, 1996; Etienne *et al.*, 2003; Weissbach *et al.*, 2005], stellte sich die Frage nach einer Beteiligung dieses Enzyms am reduktiven Metabolismus anderer funktioneller Gruppen. Dies ist insbesondere im Hinblick auf die Entwicklung neuer Prodrugprinzipien, aber auch zur besseren Vorhersagbarkeit von Arzneistoffmetaboliten von großem Interesse.

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der hMsrA auf ihre Fähigkeit zur Reduktion von Fremdstoffen. Dabei geht es insbesondere um die mögliche Beteiligung der hMsrA am reduktiven Metabolismus *N*-hydroxylierter Amidine. Für diese Untersuchungen sollte Benzamidoxim als Modellsubstrat für *N*-hydroxylierte Verbindungen gewählt und dessen Reduktion durch die rekombinant hergestellte hMsrA untersucht werden.

Außerdem ist die Substratspezifität der gereinigten mikrosomalen Benzamidoximreduktase im rekonstituierten System Ziel der Untersuchung.

Die mikrosomale Benzamidoximreduktase reduziert ein breites Spektrum an *N*-hydroxylierten Verbindungen [Clement *et al.*, 1988b; Hauptmann *et al.*, 1988; Clement *et al.*, 1993a; Clement *et al.*, 1993b; Clement und Jung, 1994; Clement *et al.*, 1996; Clement und Demesmaeker, 1997; Clement *et al.*, 2005b; Heberling *et al.*, 2006]. Aufgrund dieser recht geringen Substratspezifität der Benzamidoximreduktase lag die Vermutung nahe, dass diese möglicherweise auch andere

Reduktionsreaktionen katalysieren könnte. Die Testung der mikrosomalen Benzamidoximreduktase auf Methioninsulfoxidreduktaseaktivität war somit ein weiteres Ziel dieser Arbeit. Zu diesem Zweck sollte Methioninsulfoxid mit gereinigten Mikrosomen, Mitochondrien und dem mikrosomalen Drei-Komponentensystem der Benzamidoximreduktase aus der Schweineleber mit verschiedenen Cosubstraten inkubiert und das dabei entstandene Methionin bestimmt werden.

3.2 Methoden

3.2.1 Materialien und Geräte

Alle verwendeten Materialien und Geräte sind in Kapitel 8 dieser Arbeit aufgeführt. Benzamidoxim wurde aus Benzonitril und Hydroxylamin synthetisiert [Krüger, 1885].

3.2.2 Enzymquellen

Mikrosomen und Mitochondrien aus Schweineleber wurden wie in Kap. 2.2 beschrieben, gewonnen. Humane rekombinante Methioninsulfoxidreduktase A (hMsrA) wurde bei LabFrontier, Seoul (Südkorea) käuflich erworben.

3.2.3 *In vitro* Reduktion von Methioninsulfoxid

3.2.3.1 Inkubationsbedingungen

Falls nicht abweichend beschrieben, wurden alle Inkubationen in 1,5 ml Reaktionsgefäßen unter aeroben Bedingungen im Schüttelwasserbad bei 37°C für 30 min inkubiert und mit 100 µl eisgekühltem Acetonitril abgestoppt. Nach 2-minütigem Schütteln wurden die Inkubationsansätze für 5 min bei 10000 U/min zentrifugiert und der Überstand in HPLC-Vials zur Analyse überführt. Alle Inkubationen wurden am selben Tag vermessen.

3.2.3.2 Inkubationsansatz mit Mikrosomen und Mitochondrien

Ein Inkubationsansatz mit Mikrosomen und Mitochondrien enthielt 0,3 mg Protein, 1,0 mM *R,S*-Methioninsulfoxid, 15 mM DTT, 0,5 mM NADH oder NADPH in 100 µl 100 mM Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 6,3. Nach 3-minütiger Vorinkubation mit Protein und Methioninsulfoxid wurde die Reaktion durch Zugabe von NADH, NADPH oder DTT gestartet.

3.2.3.3 Inkubationsansatz mit dem rekonstituierten System

Für Inkubationen mit dem aus porcinen Lebermikrosomen gereinigten rekonstituierten System wurden 100 pmol Cyt b₅, 0,5 U NADH-Cyt b₅ Reduktase und 5 µg Benzamidoximreduktase mit 40 µM DLPC in 100 µl 100 mM Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 6,3 pipettiert. Nach 3-minütiger Vorinkubation der Komponenten des rekonstituierten Systems mit DLPC wurde nach Zugabe von 1,0 mM *R,S*-Methioninsulfoxid weitere 3 min inkubiert, bevor die Reaktion durch Zugabe von 15 mM DTT oder 0,5 mM NADH bzw. NADPH in 100 mM Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 6,3 gestartet wurde.

3.2.3.4 Inkubationsansatz mit der rekombinanten hMsrA (Aktivitätstest)

Für Inkubationen mit der rekombinanten hMsrA wurden 5 µg dieses Enzyms und 1,0 mM *R,S*-Methioninsulfoxid in 100 µl 20 mM Tris-HCl-Puffer mit einem pH-Wert von 7,4 pipettiert. Nach 3-minütiger Vorinkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 15 mM DTT gestartet.

3.2.3.5 HPLC-Analytik

Eine HPLC-Methode zur Trennung von Methionin und Methioninsulfoxid wurde entwickelt. Die mobile Phase wurde durch einen Membranfilter (\varnothing 45 μ m) filtriert und im Ultraschallbad 15 min entgast. Für die Analytik wurde folgendes System verwendet:

HPLC Pumpe:	Waters 510 HPLC-Pump
Autosampler:	WISP 710B Autosampler
Detektor:	Waters 486 Turn able Absorbance Detector
Degasser:	Erc-3512 Degasser, Erma (Tokyo)
Interface:	Waters System Interface Module
Software:	Maxima 820
Stationäre Phase:	LiChroCART [®] 250-4 HPLC-Kartusche mit LiChrospher [®] 60 RP-select B (5 μ m), Vorsäule RP-select B, 4 x 4 mm (Merck, Darmstadt)
Mobile Phase:	1 mM 1-Octylsulfonat <i>in Aqua bidest.</i> , pH 3,5
Nachsäulen-derivatisierung:	1,5 mM <i>o</i> -Phthaldialdehyd 7 mM 2-Mercaptoethanol 0,07 mM NaOH 0,13 mM H ₃ BO ₃
Flussrate:	1,0 ml/min
Laufzeit:	30 min
Detektion:	Fluoreszenz Em 480 nm, Ex 340 nm
Injektionsvolumen:	20 μ l

Zur Kalibrierung wurde ein doppelter Ansatz sechs verschiedener Konzentrationen (0,5-50 μ M) Methioninsulfoxid je zweimal vermessen. Die Kalibriergerade war in dem ermittelten Konzentrationsbereich linear ($r^2=0,9994$). *R,S*-Methioninsulfoxid wurde nach $3,8 \pm 0,1$ min und *R,S*-Methionin nach $10,4 \pm 0,0$ min eluiert.

Die Wiederfindungsrate wurde ermittelt, indem die gleichen, für die Kalibrierung verwendeten Konzentrationen, den Inkubationsansätzen zugesetzt wurden, wobei

das Protein vor der Inkubation für 15 min auf 95°C erhitzt und auf die Zugabe von Cosubstrat verzichtet wurde. Alle weiteren Arbeitsschritte verliefen wie in Kap. 2.2.7 und 2.2.7.1 beschrieben. Die Wiederfindungsrate betrug $170 \pm 77\%$. Die hohe Wiederfindungsrate ist durch den natürlichen Methioninanteil in den Proteinfractionen bedingt.

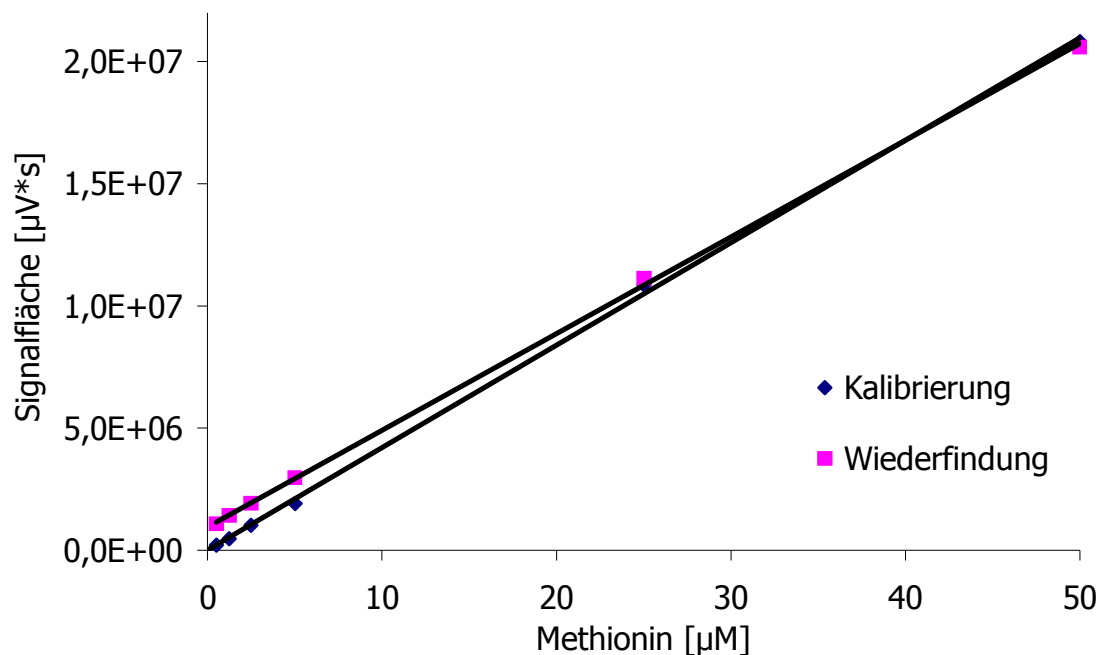


Abb. 3.4 Lineare Abhängigkeit der Methioninkonzentration von der Signalfläche.

3.2.4 Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch die humane MethioninsulfoxidreduktaseA (hMsrA)

3.2.4.1 Inkubationsansatz mit rekombinanter hMsrA

Enzymkonzentrationen von 3, 8,5 und 14 µg rekombinanter hMsrA wurden in 150 µl 100 mM Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 6,3 untersucht. Nach 3-minütiger Vorinkubation mit 1 mM Benzamidoxim wurde die Reaktion durch Cosubstratzugabe gestartet. Als Cosubstrat wurde 15 mM DTT in 100 mM Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 6,3 verwendet.

3.2.4.2 Inkubationsbedingungen

Abweichend von den in Kap. 3.2.3.1 beschriebenen Inkubationsbedingungen, wurde 150 µl eisgekühlter Methanol zum Abstoppen der Reaktion verwendet.

3.2.4.3 HPLC-Analytik

Für die Quantifizierung des Metaboliten Benzamidin wurde die von Friedrich [2003] beschriebene HPLC-Methode verwendet. Der Eluent wurde durch einen Membranfilter (\varnothing 45 µm) filtriert und im Ultraschallbad 15 min entgast. Für die Analytik kam folgendes System zur Anwendung:

HPLC Pumpe:	Waters™ 1525 binary HPLC pump
Autosampler:	717 plus auto sampler
Detektor:	2487 dual λ absorbance detector
Software:	Breeze® chromatography software Version 3.30
Stationäre Phase:	LiChroCART® 250-4 HPLC-Kartusche mit LiChrospher® 60 RP-select B (5 µm), Vorsäule RP-select B, 4 x 4 mm (Merck, Darmstadt)
Mobile Phase:	10 mM 1-Octylsulfonat <i>in Aqua bidest.</i> /Acetonitril 83:17 (v/v)
Flussrate:	1,0 ml/min
Laufzeit:	30 min
Detektion:	UV, 229 nm
Injektionsvolumen:	10 µl

Die Retentionszeiten betrugen für Benzamidoxim $7,5 \pm 0,1$ min und für Benzamidin $19,6 \pm 0,6$ min. Die Bestimmungsgrenze lag bei 20 µM.

3.3 Ergebnisse

3.3.1 Enzymatische Reduktion von Methioninsulfoxid

3.3.1.1 Reduktion in Mikrosomen und Mitochondrien

Porcine Lebermikrosomen und -mitochondrien reduzieren Methioninsulfoxid in Gegenwart von DTT. Der Zusatz von NADH oder NADPH zum Inkubationsansatz mit DTT führte zu keiner signifikanten Änderung der Umsetzungsrate bei beiden Präparationen. In Mikrosomen konnte mit NADH und NADPH keine Umsetzung des Methioninsulfoxids detektiert werden, während in Mitochondrien eine geringe Reduktion nachweisbar war.

Für die DTT-abhängige Methioninsulfoxidreduktion ist kein signifikanter Unterschied zwischen den Umsetzungsraten der beiden aus porciner Leber gereinigten Zellkompartimente vorhanden.

<i>pmol Methionin/(min*mg Protein)</i>					
	NADH	NADPH	DTT	DTT + NADH	DTT + NADPH
Mikrosomen	ND	ND	69 ± 24	75 ± 1	39 ± 2
Mitochondrien	16 ± 5	16 ± 1	47 ± 14	48 ± 2	64 ± 6

Tab. 3.2 Reduktion von Methioninsulfoxid mit porcinen Leberpräparationen.

Die Inkubationsansätze enthielten: 0,3 mg Protein, 1,0 mM R,S-Methioninsulfoxid, 15 mM DTT, 0,5 mM NADH oder NADPH in 100 µl 100 mM Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 6,3. Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten. Durchführung und Aufarbeitung der Reaktionsansätze sind in Kap. 3.2.3.1 beschrieben. Die ermittelten Umsetzungen sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus mindestens zwei Inkubationsansätzen, die je zweimal analysiert wurden. ND – nicht detektierbar

3.3.1.2 Reduktion mit dem mikrosomalen rekonstituierten System

Mit dem aus porcinen Lebermikrosomen gereinigten rekonstituierten System konnte mit keinem der untersuchten Cosubstrate eine Methioninsulfoxidreduktaseaktivität nachgewiesen werden.

3.3.1.3 Reduktion mit der hMsrA (Aktivitätstest)

Zur Überprüfung der Aktivität der rekombinanten hMsrA wurde diese mit Methioninsulfoxid und DTT inkubiert und die Umsatzungsrate ermittelt.

Die Umsatzungsrate wurde aus dem Mittelwert \pm Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen bestimmt, welche jeweils doppelt vermessen wurden.

Für die hMsrA wurde eine Aktivität von 65 ± 0 nmol/(min*mg) bestimmt.

3.3.2 Reduktion von Benzamidoxim mit der hMsrA

Die Benzamidoximreduktaseaktivität des Enzyms wurde überprüft. Für die eingesetzten hMsrA-Konzentrationen konnte keine Benzamidoximreduktaseaktivität bestimmt werden.

3.4 Diskussion

Das ubiquitäre Vorkommen der hMsrA in Säugern mit hohen Expressionsraten in den metabolisierenden Organen Leber und Niere [Kuschel *et al.*, 1999; Moskovitz *et al.*, 1996] und die Katalyse der Reduktion zahlreicher Substrate mit Methylsulfoxidgruppen [Moskovitz *et al.*, 1996; Etienne *et al.*, 2003; Weissbach *et al.*, 2005] ließen vermuten, dass dieses Enzym auch am Metabolismus anderer funktioneller Gruppen beteiligt sein könnte. Dennoch ist bislang keine Beteiligung der hMsrA an einer anderen Reduktionsreaktion als der Sulfoxidreduktion beschrieben wurden. Die Reduktion *N*-hydroxylierter Amidine ist aufgrund der Verwendung dieser funktionellen Gruppe in Prodrugs gut erforscht und kann von verschiedenen Enzymen katalysiert werden. Die Kenntnis der an der Reduktion stickstoffhaltiger funktioneller Gruppen beteiligten Enzyme ist für die Vorhersage von Art und Entstehungsort der Metaboliten im Organismus von entscheidender Bedeutung.

Bei Untersuchungen zur Lokalisation und Aktivität der hMsrA im Menschen wurde diese auch in der Leber nachgewiesen [Kuschel *et al.*, 1999; Moskovitz *et al.*, 1996]. Auch mit verschiedenen Zellkompartimenten der Rattenleber wurde die *in vitro* Reduktion des Methioninsulfoxids beschrieben [Aymard *et al.* 1979]. Demnach war auch in porcinen Leberpräparationen eine Methioninsulfoxidreduktaseaktivität zu vermuten.

Die Inkubationen von Methioninsulfoxid mit porcinen Mitochondrien und Mikrosomen bestätigten diese Vermutung. Methioninsulfoxid wird sowohl von Mitochondrien, als auch von Mikrosomen aus der Schweineleber reduziert. Die Reduktion verläuft jedoch nur in Gegenwart des Cosubstrates DTT, während lediglich die Mitochondrien eine schwache Umsetzung in Gegenwart von NADH und NADPH zeigten. Im Vergleich zur NADH-abhängigen Benzamidoximreduktaseaktivität dieser Zellkompartimente ist die Methioninsulfoxidreduktion sehr schwach ausgeprägt. Dies ist möglicherweise durch eine NAD(P)H-abhängige Rückreaktion bedingt, wie die Oxidation des Methionins zum Methioninsulfoxid durch FMOs unter Verbrauch von NADPH [Duescher *et al.*, 1994; Krause *et al.*, 1996; Ripp *et al.*, 1999; Hoshi und Heinemann, 2001]. Die

deutliche Cosubstratpräferenz für DTT, welches im *in vitro* Assay die Funktion des Thioredoxin/Thioredoxinreduktase-Systems imitiert [Moskovitz *et al.*, 1996], ist ein Indiz dafür, dass die Methioninsulfoxidreduktase das hauptsächlich verantwortliche Enzym für die Sulfoxidreduktion in Mikrosomen und Mitochondrien ist.

Die sehr geringen NAD(P)H-abhängigen Umsetzungsraten in den Mitochondrien sind wahrscheinlich auf andere mitochondriale Enzyme zurückzuführen, wie z.B. die Aldehydoxidase, deren Beteiligung an Sulfoxidreduktionen bekannt ist [Yoshihara und Tatsumi, 1990; Tatsumi *et al.*, 1983; Felsted *et al.*, 1973]. Die *in vivo* Relevanz des Einflusses dieser NAD(P)H-abhängigen Enzyme für die gesamte Methioninsulfoxidreduktion ist jedoch fraglich.

Das aus porcinen Lebermikrosomen gereinigte rekonstituierte System der Benzamidoximreduktase, das unter NADH- bzw. NADPH-Verbrauch die Reduktion *N*-hydroxylierter Amidine katalysiert, zeigte keine Methioninsulfoxidreduktaseaktivität. Auch Untersuchungen mit der rekombinanten hMsrA im porcinen, mikrosomalen rekonstituierten System ergaben keine Aktivität für die Reduktion des Benzamidoxims. Demnach kann nicht von einer Beteiligung der hMsrA an der Reduktion *N*-hydroxylierter Amidine ausgegangen werden.

Diese Ergebnisse belegen die hohe Spezifität der hMsrA für Sulfoxide zum einen und der Benzamidoximreduktase für *N*-hydroxylierte Verbindungen zum anderen. Das Spektrum der akzeptierten Substrate konnte bei beiden Reduktasen nicht erweitert werden.

3.5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollte einerseits die hMsrA auf ihre Fähigkeit zur Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen und andererseits die Benzamidoximreduktase auf Methioninsulfoxidreduktaseaktivität überprüft werden.

Die untersuchten porcinen Leberpräparationen zeigten nur geringe Methioninsulfoxidreduktaseaktivität in Gegenwart von DTT. Mit NADH bzw. NADPH als Cosubstrat konnte in Mikrosomen keine und in Mitochondrien lediglich geringe Aktivität nachgewiesen werden.

Mit dem rekonstituierten System aus Cyt b₅/NADH-Cyt b₅-Reduktase und Benzamidoximreduktase, welches effizient die Benzamidoximreduktion katalysiert, konnte keine Methioninsulfoxidreduktaseaktivität detektiert werden.

Auch *in vitro* Untersuchungen mit rekombinant hergestellter hMsrA und Benzamidoxim als Testsubstrat ergaben keine Aktivität für die untersuchte Reduktion.

Somit konnte weder für die hMsrA noch für die Benzamidoximreduktase eine Beteiligung an der Reduktion von Verbindungen einer neuen Substratklasse nachgewiesen werden.

4 BETEILIGUNG DER STEAROYL-CoA DESATURASE (SCD) AN DER REDUKTION VON N-HYDROXY-AMIDINEN (AMIDOXIMEN) IM PORCINEN FETTGEWEBE

4.1 Einleitung

4.1.1 Fettgewebe

Fettgewebe ist eine Form des Bindegewebes und besteht im erwachsenen Organismus hauptsächlich aus Fettzellen (Adipozyten), die durch Kollagenfasern zu Fettläppchen zusammengefasst werden (Abb. 4.1) [Pschyrembel, 1998]. Diese Fettläppchen werden von versorgenden Blutgefäßen durchzogen.

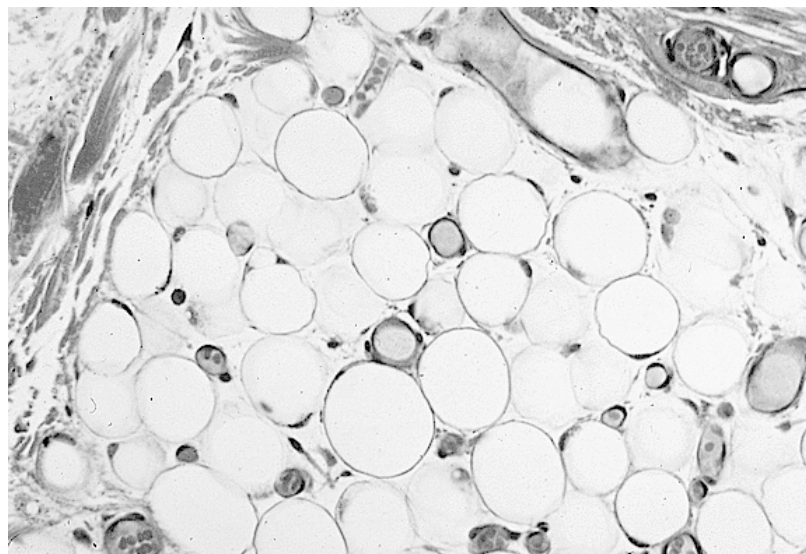


Abb. 4.1 *Lichtmikroskopische Aufnahme vom humanen, weißen Unterhautfettgewebe. [Wagner und Hossler, 2007]*

Allgemein lässt sich weißes und braunes Fettgewebe unterscheiden. Braunes Fettgewebe dient vor allem der Wärmeregulierung. Bei großen Säugern, also auch beim Menschen, bildet sich dieses Gewebe bereits im Neugeborenenstatus nahezu vollständig zurück.

Das weiße Fettgewebe besteht aus großen Fettzellen (40-150 µm), die je eine Lipidvakuole enthalten, die bis zu 95% des Gesamtzellvolumens einnimmt.

Das Fettgewebe dient hauptsächlich als Energiereservoir und Kohlenstoffquelle. Die Fettspeicherung und der Fettabbau werden hormonell reguliert. Das Fettgewebe ist aber auch selbst in der Lage, neben den Enzymen des Fettsäuremetabolismus mehr als 100 verschiedene Botenstoffe wie Leptin [Klein *et al.*, 1996], Adiponectin [Scherer *et al.*, 1995], Resistin [Steppan *et al.*, 2001], Entzündungsfaktoren [Fain *et al.*, 2004], Gerinnungsfaktoren [Mertens und Van Gaal, 2002] u. a. zu produzieren und auszusenden. Außerdem wurden sämtliche Enzyme für die Aktivierung, Umwandlung und Inaktivierung von Steroidhormonen im Fettgewebe, darunter auch die Cytochrom P450-abhängige Aromatase, nachgewiesen [Belanger *et al.*, 2002; Meseguer *et al.*, 2002]. Yoshinari *et al.* [2004; 2006] konnten nicht nur die Präsenz verschiedener detoxifizierender Enzyme wie z. B. von mehreren Cytochrom P450-Isoenzymen und Aldehyddehydrogenasen nachweisen, sondern auch deren Induktion durch typische P450-Induktoren (Phenobarbital, Dexamethason). Somit können lipophile Substanzen, die im Fettgewebe akkumulieren, auch dazu in der Lage sein, Detoxifizierungsmechanismen in diesem Gewebe auszulösen.

Das Fettgewebe ist nicht nur als eine Art ruhendes Energiedepot zu betrachten, sondern vielmehr als ein endokrines Organ [Ahima und Flier, 2000; Kershaw und Flier, 2004].

Lipophile Substanzen neigen zur Akkumulation im Fettgewebe. Der physiologische Sinn der Anreicherung solcher Substanzen im Fettgewebe könnte möglicherweise im Schutz empfindlicherer Gewebe gegen diese Verbindungen liegen, da sich viele toxische Substanzen durch eine große Lipophilie auszeichnen [Geyer *et al.*, 1993]. Die Erkenntnis über den Zusammenhang zwischen der Lipophilie einer Substanz und deren Anreicherung im Fettgewebe beruht auf *in vitro* Untersuchungen [Betschart *et al.*, 1988; Yokogawa *et al.*, 1990]. Obwohl auch *in vivo* die Anreicherung lipophiler Substanzen gezeigt werden konnte [Johansson, 1989; Levisky *et al.*, 2000], sind neben der Lipophilie einer Substanz weitere Faktoren für die Gewebsverteilung verantwortlich. Untersuchungen von Bickel [1984] und Minder *et al.* [1994] ergaben, dass *in vivo* die kompetitive Bindung der Substanz zwischen anderen, besser durchbluteten Geweben und dem Fettgewebe ausschlaggebend für deren Gewebs-

verteilung ist. Dies bedeutet folglich, dass einerseits die generelle Aussage der Akkumulation von lipophilen Substanzen im Fettgewebe, nicht für alle lipophile Stoffe zutreffend sein muss, aber andererseits auch die Anreicherung von minder lipophilen Substanzen wie Amitriptylin, Diphenhydramin u. a. im Fettgewebe [Levisky *et al.*, 2000].

Das Schwein hat sich bereits in zahlreichen *in vitro* und *in vivo* Biotransformationsstudien als geeignetes Modell erwiesen. Die enzymatische Ausstattung des Schweins scheint der des Menschen sehr nahe zu kommen [Douglas, 1972]. So weist auch das humane Fettgewebe bezüglich der Enzymaktivitäten weitaus größere Ähnlichkeiten zum porcinen Fettgewebe auf als beispielsweise zum Fettgewebe aus der Ratte [Schwandt *et al.*, 1971].

Für die Untersuchung der vorliegenden Arbeit wurden Mikrosomen aus weißem Unterhautfettgewebe vom Schwein verwendet.

4.1.2 Stearoyl-CoA Desaturase

Desaturasen spielen in nahezu allen aeroben Lebewesen eine entscheidende Rolle bei der Fettsäurebiosynthese. Allgemein lassen sich Desaturasen in zwei Klassen unterteilen: Zum einen in die kleinere Klasse der löslichen Desaturasen, die ausschließlich in Pflanzen vorkommt und zum anderen in die weitaus größere Klasse der membrangebundenen Desaturasen, die auch im Säuger anzutreffen ist [Fulco, 1974; Shanklin und Cahoon, 1998; Tocher *et al.*, 1998]. Während die membranständigen Desaturasen NADH als Cosubstrat verwenden, wird von der löslichen Form NADPH bevorzugt.

Für die Untersuchungen der Desaturasen auf eine Beteiligung am Fremdstoffmetabolismus von Säugern war insbesondere die NADH-abhängige membranständige Stearoyl-CoA Desaturase von Interesse.

Die Stearoyl-CoA Desaturase (SCD) (auch als Δ^9 -Desaturase bekannt) ist ein membranständiges Enzym des Endoplasmatischen Retikulums, welches den letzten Schritt der Biosynthese einfach ungesättigter Fettsäuren aus gesättigten Fettsäuren katalysiert [Strittmatter *et al.*, 1974].

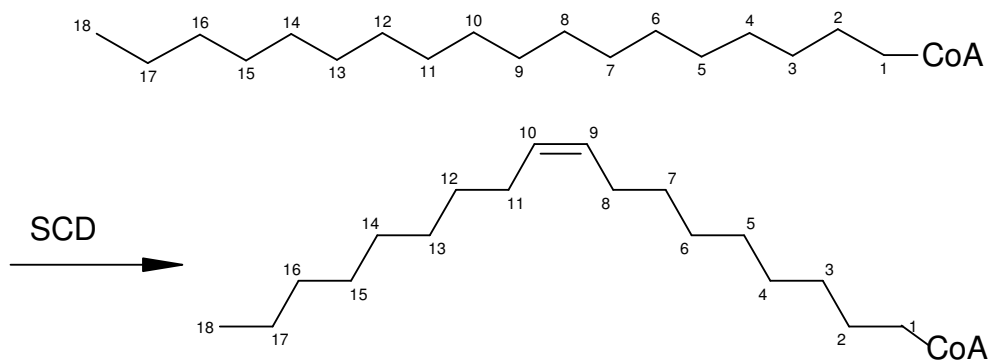


Abb. 4.2 Die SCD-katalysierte Oxidation von Stearoyl-CoA zu Oleoyl-CoA.

Bei dieser oxidativen Reaktion wird in die Kohlenwasserstoffkette der Fettsäure zwischen dem neunten und dem zehnten C-Atom eine Doppelbindung eingeführt (Abb. 4.2). Substrate der SCD sind vor allem längerkettige, unsubstituierte Fettsäuren mit einer Kettenlänge von 12 bis 19 Kohlenstoffatomen. Diese Fettsäuren müssen in der aktivierten Form als Coenzym A (CoA)-Ester vorliegen. Palmitoyl- und Stearoyl-CoA, die zu Palmitoleoyl- bzw. Oleoyl-CoA umgesetzt werden, sind die bevorzugten Substrate der SCD [Enoch et al., 1976].

4.1.2.1 Mechanismus

SCD ist das terminale Enzym im Desaturase-System. Dieses besteht aus den Elektronenüberträgern Cyt b_5 , Cyt b_5 -Reduktase sowie der SCD [Holloway, 1971; Strittmatter *et al.*, 1974] (Abb. 4.3). Im ersten Schritt werden zwei Elektronen vom Cosubstrat NADH auf die flavinhaltige NADH-Cyt b_5 -Reduktase übertragen. Diese reduziert durch Übertragung von zwei weiteren Elektronen zwei Moleküle Cyt b_5 , welche die Elektronen auf die beiden Eisenatome des Di-Eisenzentrums im katalytischen Zentrum der Desaturase übertragen [Stryer *et al.*, 2003].

Die Stearoyl-CoA Desaturase katalysiert die Oxidation langkettiger, gesättigter Fettsäure-CoA-Ester zum entsprechenden *cis*-Isomer des *delta* neun einfach ungesättigten Esters. Diese Reaktion verläuft ähnlich einem Cytochrom b_5 -abhängigen Monooxygenasemechanismus. Dabei oxidiert ein Sauerstoffatom das Substrat und das zweite Sauerstoffatom wird durch NADH zu Wasser reduziert. Da

die SCD bei der Einführung der Doppelbindung zwei Wasserstoffatome abspaltet, werden bei dieser Reaktion beide Sauerstoffatome zu Wasser reduziert [Stryer *et al.*, 2003].

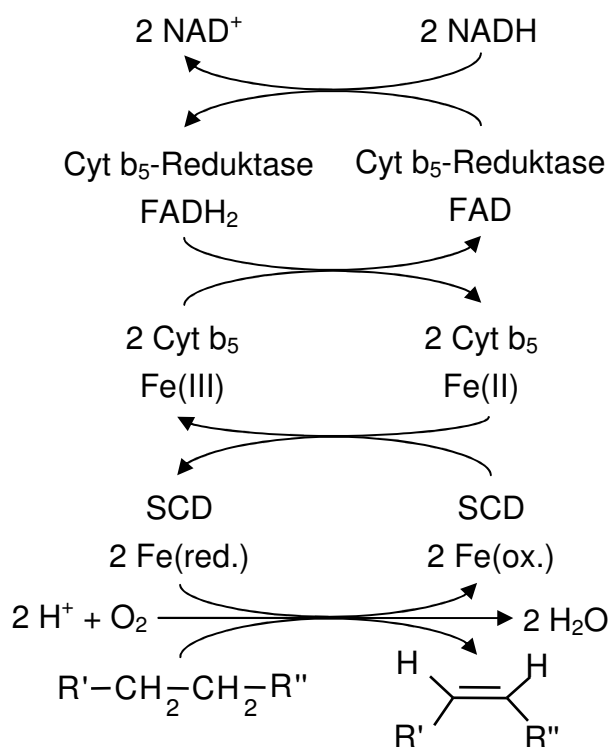


Abb. 4.3 Elektronentransfersystem der Stearoyl-CoA Desaturase.

Für diese Reduktion wird ein Zwei-Schritt-Mechanismus diskutiert (Abb. 4.4). Mitterweile mehrten sich Hinweise, dass dieser Mechanismus für alle membranständige Desaturasen gilt [Buist, 2004]. Der erste Schritt, die Abspaltung eines Wasserstoffatoms an der C9-Position, ist geschwindigkeitsbestimmend für die gesamte Reaktion. Daraus resultiert eine instabile radikalische Zwischenstufe, die unter Abspaltung eines zweiten Wasserstoffatoms zügig zum Endprodukt und Wasser weiter reagiert [Behrouzian *et al.*, 2001].

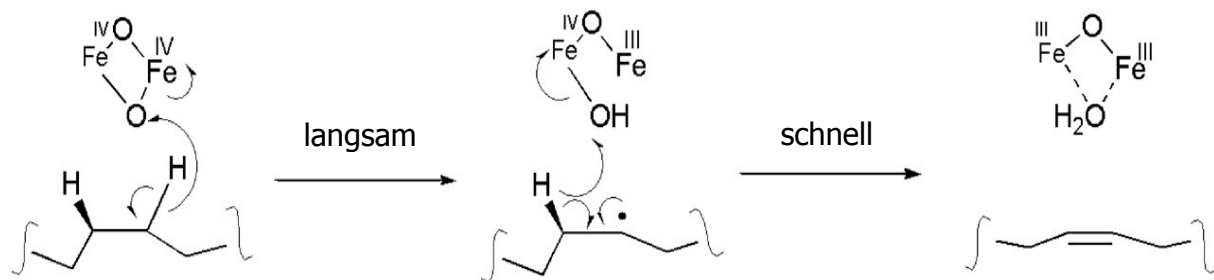


Abb. 4.4 Reaktionsmechanismus der SCD [Behrouzian *et al.*, 2001].

4.1.2.2 Eigenschaften

Um die Eigenschaften der membranständigen SCD genauer untersuchen zu können, wurde versucht, dieses Enzym zu isolieren. Zwar konnten Strittmatter *et al.* [1974] SCD aus Rattenlebermikrosomen gewinnen, das gereinigte Enzym war jedoch außerhalb seiner gewohnten hydrophoben Umgebung sehr instabil und zeigte nur geringe Aktivität im rekonstituierten System aus Cyt b₅ und NADH-Cyt b₅-Reduktase. Zudem entdeckte Ozols [1997] eine membranständige spezifische SCD-Protease in Rattenlebermikrosomen, welche offenbar an der Regulierung der SCD-Aktivität in der Rattenleber beteiligt ist und die Halbwertszeit der SCD in diesem Organ auf 3-4 h beschränkt [Heinemann und Ozols, 1998; Heinemann *et al.*, 2003]. *In vitro* Untersuchungen mit der SCD werden deshalb mit den stabileren mikrosomalen Präparationen aus dem Fettgewebe durchgeführt und nicht mit dem gereinigten Enzym.

Die Stearoyl-CoA Desaturaseaktivität ist in Gegenwart von Cyaniden reduziert [Hiwatashi *et al.*, 1975; Prasad und Joshi 1979], während Kohlenmonoxid (CO) keinen Einfluss auf die Aktivität hat. Die Cyanidsensitivität und die Unempfindlichkeit gegen Kohlenmonoxid sind Indikatoren für nicht häm-gebundenes Eisen im katalytischen Zentrum [Stryer *et al.*, 2003].

Die Sensitivität der SCD gegen *p*-Hydroxymercuribenzoat (einem Hemmstoff, der u. a. mit Thiolgruppen reagiert) [Raju und Reiser, 1967] führte zu der Überlegung, dass eventuell Cysteinreste in der Aminosäuresequenz für die Aktivität der SCD essentiell sein könnten. Mit Hilfe von murinen SCD-Mutanten konnte für keinen der konservierten Cysteinreste eine katalytische Bedeutung nachgewiesen werden [Man *et al.*, 2006].

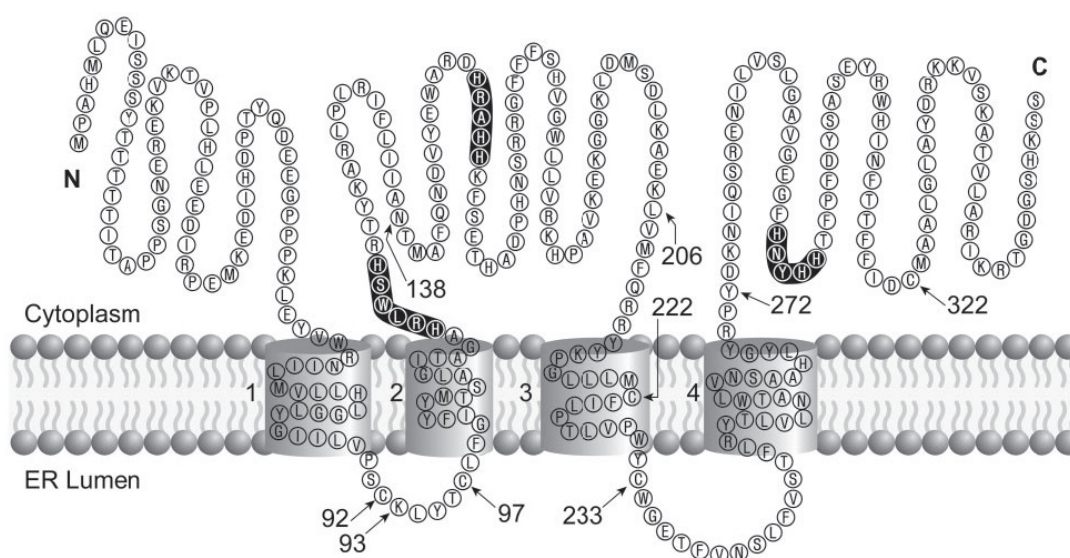


Abb. 4.5 Modell einer membrangebundenen murinen SCD1 [Man et al., 2006].

Die Abbildung zeigt, dass der N- und der C-Terminus sowie eine hydrophile Schleife auf der cytosolischen Seite (Cytoplasm) und zwei kleinere hydrophile Schleifen auf der Seite des Endoplasmatischen Retikulums (ER Lumen) liegen. Dunkel markiert sind die drei Histidin-reichen Bereiche. Mit Pfeilen und Zahlen gekennzeichnet sind Histidinreste, deren Bedeutung für die katalytische Aktivität der Desaturasen diskutiert wurde, aber nicht bestätigt werden konnte [Man et al., 2006].

Membrangebundene Desaturasen weisen eine hohe Sequenzhomologie auf. So wurden über den Vergleich von mittlerweile in großer Zahl vorhandener Sequenzdaten bestimmte hochkonservierte strukturelle Segmente der membrangebundenen Desaturasen manifestiert [Knipple et al., 2002; Sperling et al., 2003]. Dazu gehören ein hydrophober Bereich, der vier transmembranäre Helices bildet, und acht essentielle Histidinreste, die in den drei histidinreichen Regionen (Histidinboxen) auf der dem Cytoplasma zugewandten Seite für die Koordination des Di-Eisenzentrums verantwortlich sind (Abb. 4.5) [Shanklin et al., 1994; Broadwater et al., 1998]. Zwischen den hochkonservierten Regionen befinden sich variable, hydrophile Bereiche, die für eine gewisse Präferenz einzelner SCD-Isoformen für Fettsäuren mit bestimmter Kettenlänge ursächlich sein könnten [Knipple et al., 2002; Sperling et al., 2003; Man et al., 2006].

4.1.2.3 Physiologische Funktionen

Die von der SCD gebildeten einfach ungesättigten Fettsäuren sind Bestandteil zahlreicher Triglyzeride, Phospholipide, Cholesterol, Wachsester und anderer Lipide. Die Ölsäure ist die am häufigsten vorkommende Fettsäure im humanen Fettgewebe und in den Phospholipidmembranen von Erythrozyten.

Einfach ungesättigte Fettsäuren können als Mediator bei der Signaltransduktion [Kasai *et al.*, 1998] und der Apoptose fungieren [Artwohl *et al.*, 2004]. Das Verhältnis von Stearinsäure/Ölsäure in der Zellmembran wirkt sich auf die Membranfluidität aus. Diese hat wiederum einen entscheidenden Einfluss auf die Zelldifferenzierung und das Zellwachstum [Ntambi, 1995; Scaglia und Igal, 2005].

4.1.2.4 Isoformen

Das SCD-Gen wurde bereits in vielen Säugern isoliert. Generell haben alle SCD-Gene von Säugern eine sehr ähnliche Struktur. Mit vier SCD-Genen wurde in der Maus die größte Anzahl an SCD Isoformen identifiziert. Sie unterscheiden sich vor allem in ihrer Expressionsrate in den unterschiedlichen Geweben (Tab. 4.1). Im Menschen sind bis *dato* zwei Isoformen bekannt, von denen hSCD1 vornehmlich im Fettgewebe lokalisiert ist und hSCD2 hauptsächlich im Gehirn zu finden ist [Zhang *et al.*, 1999; Miyazaki *et al.*, 2001; Beiraghi *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004].

Im Schwein ist bislang nur eine SCD-Isoform bekannt, pSCD1. Diese ist hauptsächlich im Fettgewebe und in geringerem Ausmaß in der Leber exprimiert [Ren *et al.*, 2004]. Neuere Untersuchungen lassen eine weitere SCD-Isoform im porcinen Muskelgewebe vermuten [Doran *et al.*, 2006].

In manchen Geweben (z. B. dem Fettgewebe) werden mehrere SCD-Isoformen parallel exprimiert. Die Ursache für die Expression verschiedener SCD-Isoformen in einem Gewebe ist jedoch noch unklar.

	<i>Isoenzyme</i>	<i>Lokalisation</i>
<i>Mensch</i>		
[Zhang <i>et al.</i> , 1999; Miyazaki <i>et al.</i> , 2001; Beiraghi <i>et al.</i> , 2003; Wang <i>et al.</i> , 2004]	hSCD1	Fettgewebe, Leber
	hSCD2/5	Gehirn, Pankreas
<i>Schwein</i>		
[Ren <i>et al.</i> , 2004]	pSCD1	Fettgewebe, Leber
<i>Ratte</i>		
[Mihara, 1990; Moreau <i>et al.</i> , 2006]	rSCD1	Fettgewebe, Leber
	rSCD2	Gehirn
<i>Maus</i>		
[Ntambi <i>et al.</i> , 1988; Kaestner <i>et al.</i> , 1989; Zheng <i>et al.</i> , 2001; Miyazaki <i>et al.</i> , 2003]	mSCD1	Fettgewebe, Leber
	mSCD2	Gehirn
	mSCD3	Haut
	mSCD4	Herz

Tab. 4.1 Isoenzyme der SCD und ihre hauptsächliche Gewebsverteilung in verschiedenen Spezies.

Nur die Gewebe mit den höchsten Expressionsraten für die jeweiligen SCD-Isoformen sind in der Tabelle dargestellt. Dies schließt nicht aus, dass auch andere Isoformen mit geringeren Expressionsraten in den genannten Geweben enthalten sind.

Die Aktivität und die Genexpression der SCD sind sehr stark reguliert und abhängig von zahlreichen Faktoren. So kann durch kohlenhydratreiche, fettarme Diät nach einer Fastenperiode die mRNA-Expression und die Aktivität der SCD in der Leber von Nagern induziert werden [Thiede und Strittmatter, 1985; Ntambi, 1995].

Außerdem haben der Entwicklungsstatus [Heinemann und Ozols, 2003], das Alter [Smith *et al.*, 1999], das Ausmaß an körperlicher Aktivität und die Aufnahme mehrfach ungesättigter Fettsäuren und Cholesterin einen Einfluss auf die

Expressionsrate und Aktivität der SCD [Ntambi, 1999; Park *et al.*, 2000]. Auch eine hormonelle Steuerung dieses Enzyms durch Insulin und Leptin ist beschrieben worden [Maedler *et al.*, 2001; Miyazaki und Ntambi, 2003].

4.1.3 Thema und Zielsetzung

Die verantwortlichen Enzyme für die Benzamidoximreduktaseaktivität in der porcinen Leber konnten bereits identifiziert werden. Dabei handelt es sich zum einen um ein P450 Enzym in Mikrosomen [Clement *et al.*, 1997] und zum anderen um ein molybdänhaltiges Enzym in Mitochondrien [Havemeyer *et al.*, 2006]. Im Fettgewebe beschrieben bislang nur Andersson *et al.* [2005] Benzamidoximreduktaseaktivität. Zudem ließen Untersuchungen von Johansson *et al.* [2005] eine Beteiligung der SCD an dieser Reduktion vermuten.

Ziel dieses Teiles der Arbeit ist es, die SCD auf eine mögliche Beteiligung an der Reduktion der Amidoximfunktionen zu untersuchen (Abb. 4.6).

Dafür wurden verschiedene Enzymquellen verwendet. So sollte für diese Untersuchungen die Gewinnung von Mikrosomen aus porcinem Fettgewebe etabliert und die gewonnenen Mikrosomen auf den Gehalt an P450 und an den Komponenten des Elektronentransfersystems Cyt b₅ und NADH-Cyt b₅-Reduktase untersucht werden.

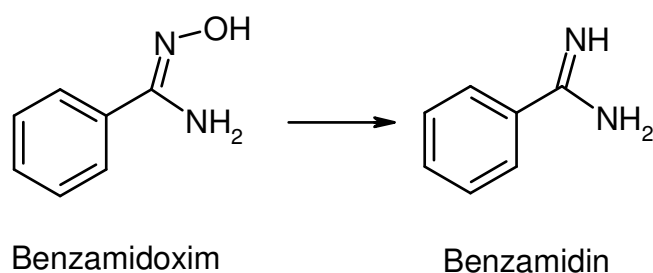


Abb. 4.6 Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin.

Durch Inkubationen des Modellsubstrates Benzamidoxim mit porcinen Fettgewebemikrosomen und verschiedenen Hemmstoffen des Elektronentransfersystems sollte dessen Bedeutung für die Benzamidoximreduktion im Fettgewebe bestimmt werden.

Der Einsatz von Hemmstoffen der SCD insbesondere eines Anti-SCD Antikörpers sollte Aufschluss über die Beteiligung der SCD an der Reduktion *N*-hydroxylierter Amidine mit porcinen Fettgewebismikrosomen geben.

Weiterhin sollten Untersuchungen der Benzamidoximreduktion mit dem rekonstituierten System durchgeführt werden. Dafür sollten aus porcinen Lebermikrosomen gereinigtes Cyt b₅, NADH-Cyt b₅-Reduktase und eine teilgereinigte SCD-Fraktion aus SCD-induzierten Rattenlebermikrosomen verwendet werden.

Der SCD-Gehalt porciner Fettgewebs- und Desaturase-induzierten Rattenlebermikrosomen sollte mit Hilfe eines Westernblots überprüft werden.

4.2 Methoden

4.2.1 Materialien und Geräte

Alle verwendeten Materialien und Geräte sind in Kapitel 8 dieser Arbeit aufgeführt. Benzamidoxim wurde aus Benzonitril und Hydroxylamin synthetisiert [Krüger, 1885].

4.2.2 Enzymquellen

4.2.2.1 Mikrosomengewinnung aus porcinem subkutanen Fettgewebe

Mikrosomen aus porcinem Fettgewebe wurden durch differentielle Ultrazentrifugation gewonnen. Alle Reinigungsschritte wurden in Reinigungspuffer (20% Glycerol, 10 mM Tris-Base (pH 8,1), 1 mM EDTA, 1 mM DTT) durchgeführt. Nur für den letzten Zentrifugationsschritt und für die Lagerung wurde Lagerpuffer (20% Glycerol, 10 mM Tris-Base (pH 8,1)) verwendet. Unterhautfettgewebe vom Schweinebauch wurde vom lokalen Schlachthof bezogen.

Unmittelbar nach der Tötung und dem Ausbluten des Tieres wurden mehrere Streifen Bauchfett abgeschnitten und bis zur Weiterverarbeitung im ca. 37°C warmen Reinigungspuffer gelagert. Pro Reinigung wurde ca. 500 g Fettgewebe von Haut- und Muskelgewebsresten gesäubert, in kleine Stücke geschnitten und mit Puffer gewaschen. Die Gewebstücke wurden danach mit einem Pürierstab zerkleinert und nach Suspension des zerkleinerten Fettgewebes mit Puffer im Verhältnis 1:1 im Durchflusshomogenisator homogenisiert.

Alle weiteren Arbeitsschritte wurden bei 4°C mit eisgekühlten Puffern durchgeführt. Nach Zentrifugation des Homogenats bei 6000*g* für 5 min wurde das abgeschiedene Fett verworfen. Der Überstand wurde durch Nylongaze in ein sauberes Zentrifugegefäß überführt und bei 10000*g* 20 min zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde erneut durch Nylongaze kolliert und bei 100000*g* 60 min zentrifugiert. Nach Resuspension des erhaltenen Pellets in Lagerpuffer wurde die Suspension bei 29000*g* 20 min zentrifugiert, das entstandene Pellet in Lagerpuffer resuspendiert und in Aliquots bei -80°C gelagert.

4.2.2.2 Teilgereinigte Stearoyl-CoA Desaturase (SCD)

Teilgereinigte SCD aus SCD-induzierten Rattenlebermikrosomen wurden, wie 1997 von Ozols beschrieben, gewonnen und freundlicherweise von Juris Ozols, Farmington, Connecticut (USA) zur Verfügung gestellt.

4.2.3 Analytik der Mikrosomencharakterisierung

Der Protein-, Cyt b₅-, P450-Gehalt sowie die Cyt b₅-Reduktaseaktivität wurde nach den in Kap. 2.2.5 beschriebenen Methoden bestimmt.

4.2.4 SDS-PAGE

SDS-PAGE wurde in Anlehnung an die Methode von Laemmli [1970] durchgeführt. Es wurden Gele mit 12% Acrylamid verwendet.

4.2.4.1 Puffer und Lösungen

Sammelgelpuffer	0,25 M Tris-Base pH 6,8 0,2% (m/v) SDS
Trenngelpuffer	0,75 M Tris-Base pH 8,8 0,2% (m/v) SDS
Probenauftragspuffer	Trenngelpuffer pH 8,8 2% (m/v) SDS 10% (m/v) Glycerol 5% (m/v) β -Mercaptoethanol 0,001% (m/v) Bromphenolblau
Elektrodenpuffer	25 mM Tris-Base pH 8,3 0,1% (m/v) SDS 195 mM Glycin

Acrylamid-Bisacrylamid-Stammlösung	30% (m/v) Acrylamid 0,8% (m/v) Bisacrylamid
APS-Stammlösung	20% (m/v) APS
Coomassie Färbelösung	2% (m/v) Coomassie Brilliant Blue R 250 10% (v/v) Eisessig 25% (v/v) Isopropanol
Entfärbelösung	12,5% (v/v) Eisessig 12,5% (v/v) Isopropanol

4.2.4.2 Zusammensetzung des Gels

Lösungen/Puffer	Sammelgel 3,6%	Trenngel 12%
Acrylamid-Stammlösung	1,7 ml	12,3 ml
Sammelgelpuffer	5 ml	----
Trenngelpuffer	----	15 ml
<i>Aqua bidest.</i>	3,3 ml	2,7 ml
APS-Lösung	0,03 ml	0,1 ml
TEMED	0,01 ml	0,03 ml

4.2.4.3 Probenvorbereitung und Probenauftrag

Die Proben wurden je nach Proteingehalt mit Probenauftragspuffer auf 1 mg Protein/ml Puffer verdünnt, geschüttelt und zusammen mit den Molekulargewichtsstandards (94; 67; 43; 30; 20,1; 14,4 kDa) 10 min bei 100°C denaturiert. Nach dem Abkühlen der Proben wurden jeweils 30 µg Protein pro Bahn aufgetragen. Vom Molekulargewichtsmarker waren 10 µl ausreichend. Alle Proben wurden in analoger Reihenfolge zweimal pro Gel aufgetragen.

4.2.4.4 Durchführung der Gelelektrophorese

Für die elektrophoretische Auftrennung der Proteine wurden Plattengele (160 mm*180 mm*1,5 mm) gegossen. Die Trennung erfolgte in einer vertikalen Kammer bei einer Spannung von 25 V, welche nach 45 min auf 50 V erhöht wurde. Beendet wurde die Gelelektrophorese nach einer Laufstrecke von 6 cm im Trenngel. Daraufhin wurde das Gel mittig geteilt und eine Hälfte mit Coomassie-Färbelösung 2 h inkubiert und anschließend in Entfärbelösung bis zum Sichtbarwerden der Proteinbanden entfärbt. Die zweite Hälfte des Gels wurde für den Westernblot verwendet.

4.2.5 Westernblot

Im Westernblot werden elektrophoretisch getrennte Proteingemischen im „semi-dry“-Verfahren auf eine Membran transferiert und mit Hilfe immunochemischer Verfahren näher analysiert.

4.2.5.1 Puffer und Lösungen

Transferpuffer	25 mM Tris-HCl, pH 8,3 114 mM Glycin 10% (v/v) Methanol
TBS-Puffer	50 mM Tris-HCl, pH 7,5 150 mM NaCl
Maleinsäurepuffer	100 mM Maleinsäure, pH 7,5 150 mM NaCl
Ponceau S-Lösung	0,1% (m/v) Ponceau S 5% (m/v) Essigsäure

Blocking-Reagenz	Blocking-Reagenz aus dem BM Chromogenic Western Blotting Kit [®] 1:10 mit Maleinsäurepuffer verdünnt
1. Antikörper (Anti-Ratte SCD1)	1 : 1000 mit TBS-Puffer verdünnt
2. Antikörper (Anti-Maus IgG/Anti-Kaninchen IgG, gekoppelt an alkalische Phosphatase aus dem Chromogenic Western Blotting Kit [®])	1 : 5000 mit TBS-Puffer verdünnt

4.2.5.2 Durchführung und Detektion

Vor der Durchführung des Westernblots wurden das Blottingpapier und die Nitrocellulose-Membran in ca. 6 x 9 cm große Stücke geschnitten. Während das Blottingpapier in Transferpuffer einweichte, wurde die Membran für ca. 15 min in *Aqua bidest.* konditioniert. Zum Aufbau des Blots wurden sechs Lagen befeuchtetes Blottingpapier übereinander auf die Elektrodenplatte gelegt. Darauf folgte die Membran, bevor das passend zugeschnittene Trenngel luftblasenfrei auf die selbige gelegt wurde. Drei weitere Lagen Blottingpapier schlossen den Blot ab.

Der Proteintransfer erfolgte bei einer Stromstärke von 90-100 mA über 50 min, wobei eine Spannung von maximal 14 V nicht überschritten wurde. Zur Überprüfung des erfolgreichen Proteintransfers wurden die Proteinbanden mit Ponceau S-Lösung kurz angefärbt und mit *Aqua bidest.* wieder entfärbt. Diese reversible Färbung hatte keinen Einfluss auf die darauffolgende Immunreaktion.

Der 30-minütigen Inkubation der Membran mit Blocking-Reagenz auf dem Schüttler, die der Blockierung unspezifischer Bindungsstellen diente, folgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper bei 4°C über Nacht. Nach einmaligem 15-minütigen und dreimaligem 5-minütigen Waschen mit TBS auf dem Schüttler erfolgte die einstündige Inkubation der Membran mit dem zweiten Antikörper bei Raumtemperatur. Dem erneuten viermaligen 5-minütigen Waschen folgte die Anfärbung der durch die Antikörper markierten Proteinbanden durch Zugabe des Substrates NBT/X-Phosphat.

4.2.6 *In vitro* Biotransformation des Benzamidoxims

Falls nicht abweichend beschrieben wurden alle Inkubationen in 1,5 ml Reaktionsgefäßen unter aeroben Bedingungen im Schüttelwasserbad bei 37°C inkubiert und mit eisgekühltem 20 mM 1-Octylsulfonat in Methanol abgestoppt. Nach 2-minütigem Schütteln wurden die Inkubationsansätze 5 min bei 10000 U/min zentrifugiert und der Überstand in HPLC-Vials zur Analyse überführt. Alle Inkubationen wurden am selben Tag vermessen.

4.2.6.1 Inkubationsansatz mit Mikrosomen

Ein Inkubationsansatz mit Mikrosomen enthielt 10 µg Protein, 1,0 mM Benzamidoxim und 1,0 mM NADH in einem Gesamtansatz von 100 µl 20 mM Tris-HCl mit einem pH-Wert von 7,4. Nach 3-minütiger Vorinkubation mit Protein und Benzamidoxim wurde die Reaktion durch Zugabe von NADH gestartet und nach 20 min abgestoppt.

4.2.6.2 Inkubationsansatz mit teilgereinigter SCD im rekonstituierten System

Für die Inkubationen mit dem rekonstituierten System wurden 133 pmol Cyt b₅, 0,03 U NADH-Cyt b₅-Reduktase und 3,3 µg teilgereinigte SCD in einem Gesamtansatz von 100 µl Tris-HCl-Puffer pH 7,4 mit 40 µM DLPC 3 min vorinkubiert. Nach der Zugabe von Benzamidoxim wurde für weitere 3 min vorinkubiert, bevor die Reaktion mit NADH gestartet und nach 30 min abgestoppt wurde.

4.2.6.3 Inkubationsansatz mit teilgereinigter SCD im rekonstituierten System in Abhängigkeit vom Cyt b₅-/NADH-Cyt b₅-Reduktase-verhältnis

Die Cyt b₅-Konzentration im Ansatz wurde bei konstanter NADH-Cyt b₅-Reduktasekonzentration variiert. Es wurden 133, 200 und 266 pmol Cyt b₅ und 0,03 U NADH-Cyt b₅-Reduktase eingesetzt, was einem molaren Cyt b₅-/NADH-Cyt b₅-Reduktase-verhältnis von 10:1, 15:1 und 20:1 entspricht. Der molare Flavingehalt wurde nach Yubisui und Takeshita [1980] berechnet, wonach $2,8 \cdot 10^9$ U lösliche NADH-Cyt b₅-Reduktase ca. 1 mol aktiven Flavin entsprechen.

4.2.7 Inhibitorstudien

Abweichend von dem in Kap. 4.2.6.1 beschriebenen Inkubationsschema wurde bei den Inhibitorstudien mit Cosubstrat vorinkubiert und die Reaktion durch Zugabe des Substrates gestartet.

Die Inhibitorkonzentration, die für eine 50%-ige Hemmung der Ausgangsaktivität notwendig ist (IC_{50}), wurde über eine nicht lineare Regressionsanalytik (Sigma Plot 8.0; SPSS Inc., Chicago, USA) nach der Funktion $y = y_0 + [ab/b+x]$ berechnet.

4.2.7.1 *p*-Hydroxymercuribenzoat

Die Zusammensetzung der Inkubationsansätze entsprach der Zusammensetzung, die in Kap. 4.2.6.1 beschrieben worden ist. Die Inkubationsansätze enthielten *p*-Hydroxymercuribenzoat im Konzentrationsbereich zwischen 0 und 30 μ M.

4.2.7.2 Cytochrom c

Die Zusammensetzung der Inkubationsansätze entsprach der Zusammensetzung, die in Kap. 4.2.6.1 beschrieben worden ist. Die Inkubationsansätze enthielten Cytochrom c im Konzentrationsbereich zwischen 0 und 150 μ M.

4.2.7.3 Kaliumhexacyanoferrat(III)

Die Zusammensetzung der Inkubationsansätze entsprach der Zusammensetzung, die in Kap. 4.2.6.1 beschrieben worden ist. Die Inkubationsansätze enthielten Kaliumhexacyanoferrat(III) im Konzentrationsbereich zwischen 0 und 2000 μ M.

4.2.7.4 Kaliumcyanid

Die Zusammensetzung der Inkubationsansätze entsprach der Zusammensetzung, die in Kap. 4.2.6.1 beschrieben worden ist. Die Inkubationsansätze enthielten Kaliumcyanid (KCN) im Konzentrationsbereich zwischen 0 und 2000 μ M.

4.2.7.5 Kohlenmonoxid

Die Zusammensetzung der Inkubationsansätze entsprach der Zusammensetzung, die in Kap. 4.2.6.1 beschrieben worden ist. Vor der eigentlichen Inkubation wurden die Ansätze für 30 s mit Kohlenmonoxid begast und in verschlossenen Reaktionsgefäßen 3 min mit Cosubstrat (NADH bzw. NADPH) vorinkubiert. Die Inkubation wurde anschließend durch Zugabe von Benzamidoxim gestartet.

4.2.7.6 Stearoyl-CoA

Abweichend von der in Kap. 4.2.6.1 beschriebenen Zusammensetzung der Inkubationsansätze wurde 20 µg mikrosomales Protein eingesetzt. Die Inkubationsansätze enthielten zwischen 0 und 500 µM Stearoyl-CoA.

4.2.7.7 Natriumvanadat

Die Zusammensetzung der Inkubationsansätze entsprach der Zusammensetzung, die in Kap. 4.2.6.1 beschrieben worden ist. Die Inkubationsansätze enthielten zwischen 0 und 1000 µM Natriumvanadat.

4.2.7.8 Anti-SCD Antikörper

5 µl Anti-SCD-Antikörper wurden mit porcinen Fettgewebismikrosomen inkubiert. Im Kontrollansatz wurde der Antikörper vor der Inkubation für 15 min auf 95°C erhitzt und anschließend wieder abgekühlt.

4.2.8 HPLC-Analytik

Für die Quantifizierung des Metaboliten Benzamidin wurde im Rahmen dieser Arbeit die von Friedrich [2003] beschriebene HPLC-Methode optimiert. Dabei konnte die Laufzeit unter Beibehaltung der Robustheit und Empfindlichkeit der Methode halbiert werden. Der Eluent wurde durch einen Membranfilter (45 µm) filtriert und im Ultraschallbad 15 min entgast. Für die Analytik kam folgendes System zur Anwendung:

HPLC Pumpe:	Waters™ 1525 binary HPLC pump
Autosampler:	717 plus auto sampler
Detektor:	2487 dual λ absorbance detector
Software:	Breeze chromatography software Version 3.30
Stationäre Phase:	LiChroCART® 125-4 HPLC-Kartusche mit LiChrospher® 60 RP-select B (5 μ m), Vorsäule RP-select B, 4 x 4 mm (Merck, Darmstadt)
Mobile Phase:	10 mM 1-Octylsulfonat in <i>Aqua bidest./Acetonitril</i> 83:17 (v/v) pH-Wert nicht eingestellt
Flussrate:	1,0 ml/min
Laufzeit:	15 min
Detektion:	UV, λ : 201 nm
Injektionsvolumen:	20 μ l bei Proben mit hohem Proteingehalt (> 0,01 mg/ml) 50 μ l bei Proben mit geringem Proteingehalt (< 0,01 mg/ml)

Zur Kalibrierung wurde ein doppelter Ansatz sechs verschiedener Konzentrationen (0,25-100 μ M) Benamidin je zweimal vermessen. Die Kalibriergerade war in dem ermittelten Konzentrationsbereich linear ($r^2 = 0,991$). Benamidoxim wurde nach $3,3 \pm 0,0$ min und Benamidin nach $10,7 \pm 0,1$ min eluiert.

Die Wiederfindungsrate wurde ermittelt, indem die gleichen für die Kalibrierung verwendeten Benamidinkonzentrationen den Inkubationsansätzen (Kap. 4.2.6.1) zugesetzt wurden, wobei das Protein vor der Inkubation für 15 min auf 100°C erhitzt und auf die Zugabe von Cosubstrat verzichtet wurde. Alle weiteren Arbeitsschritte verliefen wie in Kap. 4.2.6 beschrieben. Die Wiederfindungsrate betrug $106 \pm 13\%$ ($r^2 = 0,999$).

4.2.9 SCD - Aktivitätstest

Der SCD-Aktivitätstest wurde von Daniel Catheline der Arbeitsgruppe von Prof. Phillippe Legrand (Rennes, Frankreich) durchgeführt. Nach der von Legrand *et al.* [2002] beschriebenen Methode wurde die SCD-Aktivität unter Verwendung von 1-¹⁴C-markierter Stearinsäure bestimmt.

Die Inkubationsansätze enthielten verschiedene Substratkonzentrationen im Bereich von 60 nmol 1-¹⁴C-markierter Stearinsäure, 100 µl mikrosomales Protein (entsprechend zwischen 0,2 und 1 mg Protein) 0,8 mM NADH, 0,54 mM Coenzym A, 7,2 mM ATP und 6 mM MgCl₂ in einem 1 ml 150 mM Phosphatpuffer (pH 7,16).

Die Reaktion wurde durch Substratzugabe gestartet und im Schüttelwasserbad inkubiert. Abgestoppt wurde die Reaktion nach 30 min durch Zugabe von 1 ml 2 M KOH in Ethanol. Im Anschluss wurden die Inkubationsansätze für 30 min auf 70°C erhitzt. Die Fettsäuren wurden mit Säure freigesetzt, mit Diethylether extrahiert und getrocknet. Die entstandene 1-¹⁴C-markierte Ölsäure wurde mit Hilfe eines Szintillationszählers quantifiziert.

Parallel wurde bei jeder Aktivitätsbestimmung ein Kontrollansatz inkubiert, bei dem die ethanolische KOH vor dem Substrat dazugegeben wurde. Der aus dieser Kontrolle ermittelte Wert der scheinbaren Umsetzung wurde von den erhaltenen Umsetzungsraten substrahiert.

4.3 Ergebnisse

4.3.1 Cyt b₅/NADH-Cyt b₅-Reduktase

Die beiden Komponenten des rekonstituierten Systems wurden wie in Kap. 2.2.6 beschrieben aus porcinen Lebermikrosomen gewonnen.

Der Cyt b₅-Gehalt wurde über ein Differenzspektrum zwischen der oxidierten und der NADH-reduzierten Präparation nach der Methode von Estabrook und Werringloer [1978] bestimmt. Der Hämgehalt dieser Enzympräparation wurde anhand der detektierten Absorptionsdifferenz zwischen 426 und 409 nm ermittelt und betrug 21,8 nmol Cyt b₅/mg Protein. Der Proteingehalt betrug 3,1 mg/ml und wurde mittels der BCA-Methode [Smith *et al.*, 1985] bestimmt.

Die Bestimmung der NADH-Cyt b₅-Reduktaseaktivität erfolgte nach einem modifizierten Ferricyanid-Reduktionstest [Mihara und Sato, 1978]. Bei dieser spektrophotometrischen Methode wird die zeitabhängige Reduktion des Kaliumhexacyanoferrat(III) zum Kaliumhexacyanoferrat(II) durch UV-Detektion bei 420 nm gemessen.

Für die verwendete Charge wurde ein Proteingehalt von 1,8 mg/ml und eine NADH-Cyt b₅-Reduktaseaktivität von 57,1 U/mg Protein ermittelt, welche einem Flavingehalt von 20,5 nmol/mg Protein entspricht.

Der Flavingehalt wurde nach Yubisiu und Takeshita [1980] berechnet. Die Rechnung basiert auf der Korrelation der Enzymaktivität der NADH-Cyt b₅-Reduktase mit dem Flavingehalt, wonach $2,8 \cdot 10^9$ U lösliche NADH-Cyt b₅-Reduktase ca. 1 mol aktiven Flavin entsprechen.

4.3.2 Mikrosomen aus porcinem subkutanen Fettgewebe

4.3.2.1 Gehalts- und Aktivitätsbestimmungen

Die porcinen Fettgewebismikrosomen wurden auf den Gehalt bzw. die Aktivität der Komponenten des Elektronentransfersystems untersucht. Zudem wurde der P450-Gehalt dieser Präparation ermittelt. Für diese Untersuchungen kamen spektrophotometrische Analysenmethoden zum Einsatz (Kap. 2.2.7).

Der nach der Methode von Estabrook und Werringloer [1978] bestimmte Cyt b₅-Gehalt betrug 0,04 nmol Cyt b₅/mg Protein (Abb. 4.6).

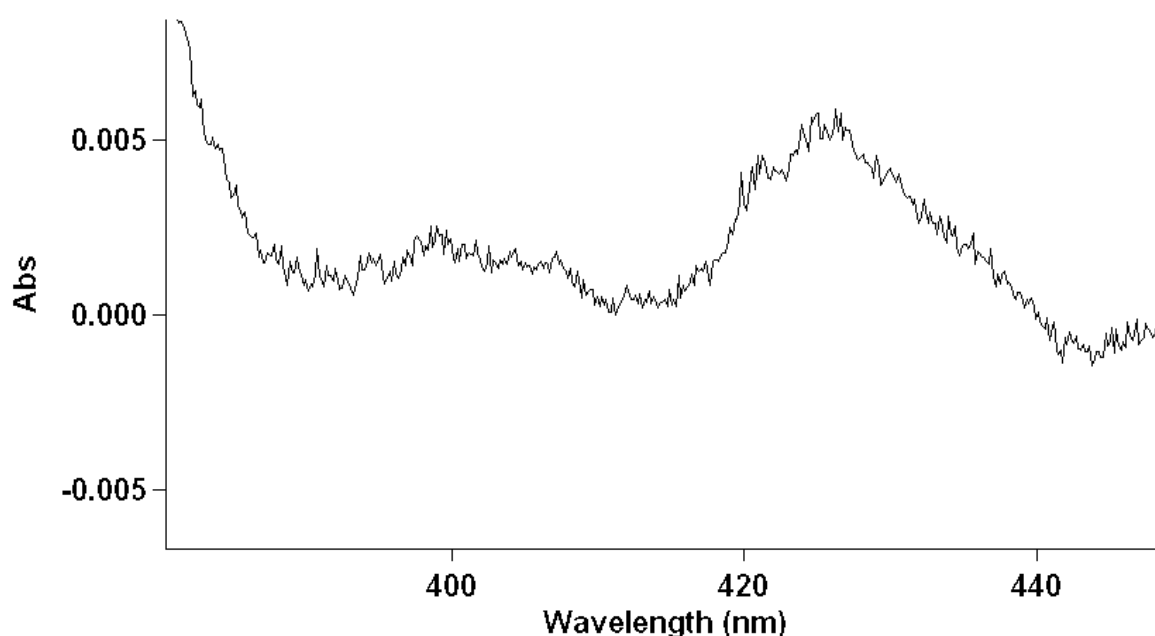


Abb. 4.6 Differenzspektrum der DTT-reduzierten porcinen Fettgewebismikrosomen.

Das Differenzspektrum wurde aus den jeweiligen Spektren der oxidierten und der NADH-reduzierten mikrosomalen Präparationen erstellt [Estabrook und Werringloer, 1978].

Die Bestimmung der NADH-Cyt b₅-Reduktaseaktivität erfolgte nach einem modifizierten Ferricyanid-Reduktionstest [Mihara und Sato, 1978]. Für die Fettgewebismikrosomen wurde eine NADH-Cyt b₅-Reduktaseaktivität von 0,12 U/mg Protein ermittelt.

Der Cytochrom P450-Gehalt wurde mittels Kohlenmonoxid nach der Methode von Omura und Sato [1964] ermittelt. Dabei wird die charakteristische Absorption des entstandenen Kohlenmonoxid-Häm-Komplexes bei 450 nm gemessen. Wie in Abb. 4.7 ersichtlich, konnte kein charakteristischer Peak bei 450 nm detektiert werden. Nur bei 420 nm zeigt sich ein deutlicher Peak.

Demzufolge liegt der Gehalt an Cytochrom P450 unterhalb der Bestimmungsgrenze von 0,5 nmol Cytochrom P450/mg Protein für dieses Verfahren.

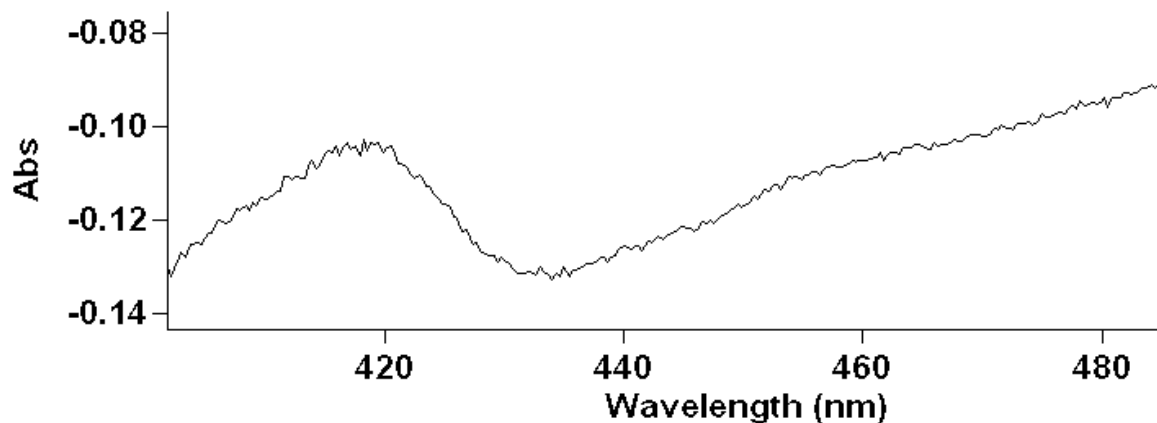


Abb. 4.7 Differenzspektrum der mit Kohlenmonoxid-begasten porcinen Fettgewebs-mikrosomen.

Das Differenzspektrum wurde aus den jeweiligen Spektren der mit Dithionit-reduzierten und anschließend mit Kohlenmonoxid-begasten mikrosomalen Präparationen erstellt [Omura und Sato, 1964].

4.3.2.2 Bedeutung der Komponenten des mikrosomalen Elektronentransfersystems für die Benzamidoximreduktion im Fettgewebe

Die Verwendung eines Elektronentransfersystems aus Cyt b₅, NADH-Cyt b₅-Reduktase und einem terminalen Protein ist sowohl für das *N*-reduktive Enzymsystem [Kadlubar und Ziegler, 1974; Clement *et al.*, 1997; Andersson *et al.*, 2005] als auch für die Stearoyl-CoA Desaturase beschrieben worden [Strittmatter *et al.*, 1974].

Um die Bedeutung dieser Elektronentransportkette für die Benzamidoximreduktion im porcinen Fettgewebe genauer untersuchen zu können, wurden Inkubationen mit einem NADH-Cyt b₅-Reduktasehemmstoff oder alternativen Elektronenakzeptoren durchgeführt.

4.3.2.2.1 *p*-Hydroxymercuribenzoat

Zur Untersuchung des Einflusses der NADH-Cyt b₅-Reduktase auf die Benzamidoximreduktion in porcinen Fettgewebismikrosomen wurde den *in vitro* Inkubationsansätzen mit *p*-Hydroxymercuribenzoat, einem Hemmstoff der NADH-Cyt b₅-Reduktase [Lostanlen *et al.*, 1978] zugesetzt. Dieser erwies sich als ein potenter Inhibitor der Reduktion (Abb. 4.8). Die *p*-Hydroxymercuribenzoatkonzentration, die zu einer 50%-igen Hemmung der Ausgangsaktivität (IC₅₀) führt, liegt bei 5,9 µM.

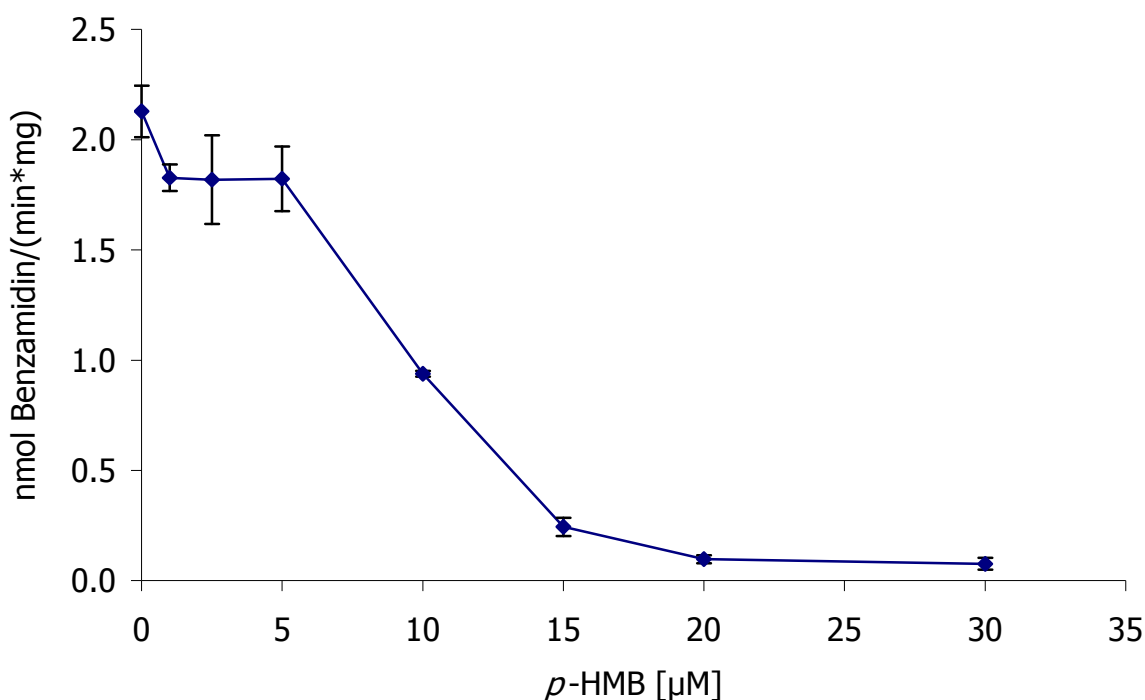


Abb. 4.8 Hemmung der Benzamidoximreduktion mit Mikrosomen aus porcinem Fettgewebe durch *p*-Hydroxymercuribenzoat (*p*-HMB).

Der Inkubationsansatz enthielt 10 µg mikrosomales Protein, 0,5 mM Benzamidoxim, und 1,0 mM NADH in 100 µl 20 mM Tris-Puffer pH 7,4. Nach der 5-minütigen Vorinkubation des mikrosomalen Proteins mit NADH und jeweils unterschiedlichen *p*-HMB-Konzentrationen wurde die Reaktion durch Zugabe von Benzamidoxim gestartet. Die weitere Durchführung erfolgte wie in Kap. 4.2.6 beschrieben. Die ermittelten Umsatzraten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

4.3.2.2.2 Kaliumhexacyanoferrat(III)

Kaliumhexacyanoferrat(III) wird *in vitro* von der NADH-Cyt b₅-Reduktase reduziert [Mihara und Sato, 1978]. Damit fungiert das Kaliumhexacyanoferrat(III) als ein alternativer Elektronenakzeptor, der die Elektronenübertragung auf das Cyt b₅ blockiert.

Die Hemmwirkung von Kaliumhexacyanoferrat(III) setzt bereits bei geringen Inhibitorkonzentrationen ein (Abb. 4.9). Für eine vollständige Hemmung der Benzamidoximreduktion in porcinen Fettgewebismikrosomen sind jedoch Konzentrationen von über 2000 μM notwendig (IC_{50} : 229 μM).

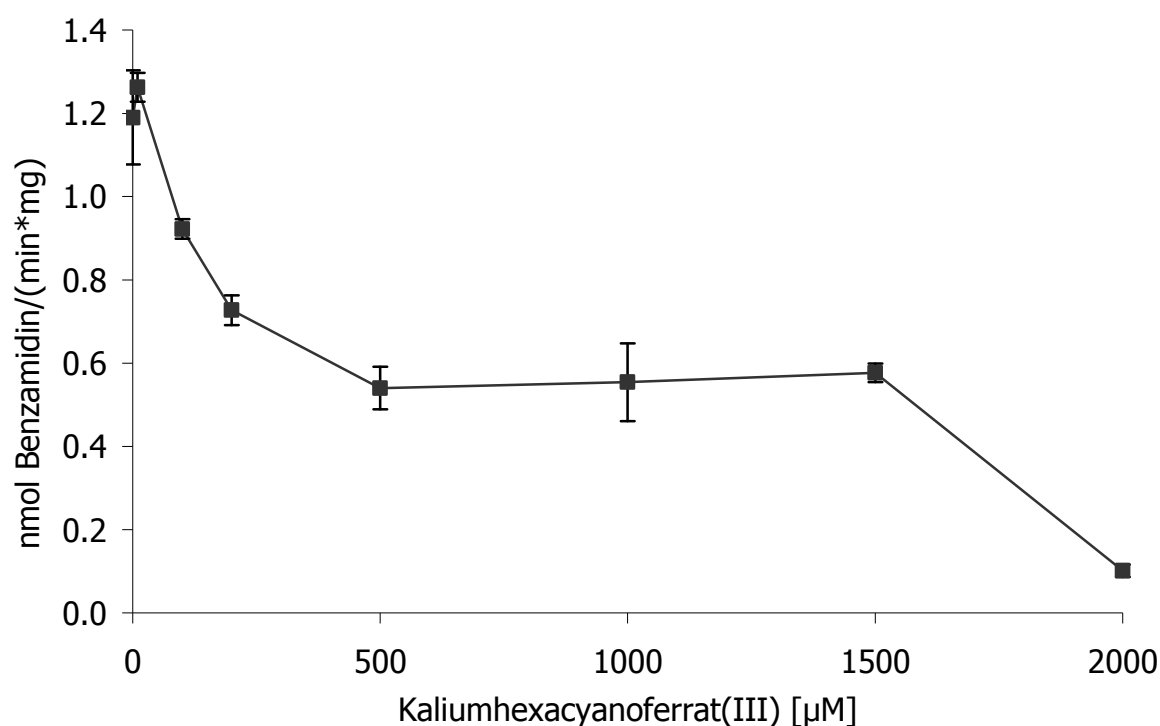


Abb. 4.9 Hemmung der Benzamidoximreduktion mit Mikrosomen aus porcinem Fettgewebe durch Kaliumhexacyanoferrat (III).

Der Inkubationsansatz enthielt 10 μg mikrosomales Protein, 0,5 mM Benzamidoxim und 1,0 mM NADH in 100 μl 20 mM Tris-Puffer pH 7,4. Nach der 5-minütigen Vorinkubation des mikrosomalen Proteins mit NADH und jeweils unterschiedlichen Kaliumhexacyanoferrat-Konzentrationen wurde die Reaktion durch Zugabe von Benzamidoxim gestartet. Die weitere Durchführung erfolgte wie in Kap. 4.2.6 beschrieben. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

4.3.2.2.3 Cytochrom c

Cytochrom c ist ein alternativer Elektronenakzeptor des Cyt b₅ [Bernardi und Azzone, 1981]. Es wird daher angenommen, dass durch Zusatz von Cytochrom c die Elektronenübertragung des Cyt b₅ auf das terminale Protein gehemmt wird. Dieses kann somit nach der katalysierten Reduktion nicht mehr in seine aktive (reduzierte) Form umgewandelt werden.

Bereits sehr geringe Cytochrom c-Konzentrationen sind für eine vollständige Hemmung der Benzamidoximreduktion in porcinen Fettgewebismikrosomen ausreichend (IC₅₀: 1,8 µM).

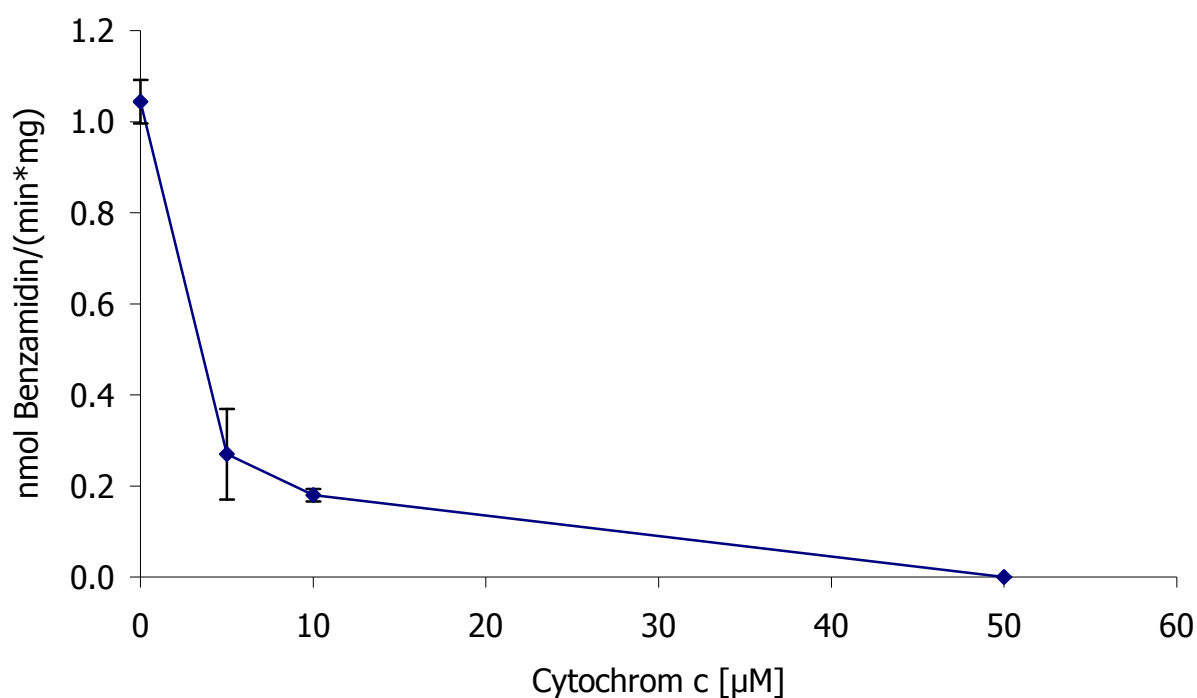


Abb. 4.10 Hemmung der Benzamidoximreduktion mit Mikrosomen aus porcinem Fettgewebe durch Cytochrom c.

Der Inkubationsansatz enthielt 10 µg mikrosomales Protein, 0,5 mM Benzamidoxim, und 1,0 mM NADH in 100 µl 20 mM Tris-Puffer pH 7,4. Nach der 5-minütigen Vorinkubation des mikrosomalen Proteins mit NADH und jeweils unterschiedlichen Cytochrom c-Konzentrationen wurde die Reaktion durch Zugabe von Benzamidoxim gestartet. Die weitere Durchführung erfolgte wie in Kap. 4.2.6 beschrieben. Die ermittelten Umsetzungsrate sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

4.3.2.3 Benzamidoximreduktion mit Mikrosomen aus porcinem Fettgewebe

Die Inkubation wurde wie in Kap. 4.2.6 beschrieben durchgeführt. Die ermittelte Umsetzungsrate ist der Mittelwert \pm Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

Porcine Fettgewebemikrosomen reduzieren Benzamidoxim mit einer Aktivität von $1,9 \pm 0,1$ nmol/(min*mg).

Für die Untersuchung der Cosubstratprävalenz wurde bei dem im Kap. 4.2.6.1 beschriebenen Inkubationsabsatz NADH durch die äquimolare Menge NADPH ersetzt. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

In Gegenwart des Cosubstrates NADH beträgt die Umsetzungsrate des Benzamidoxims ca. das Dreifache im Vergleich zur NADPH-abhängigen Reduktion ($p < 0,001$). Demnach ist NADH eindeutig das bevorzugte Cosubstrat dieser Reduktion in porcinen Fettgewebemikrosomen (Abb. 4.11).

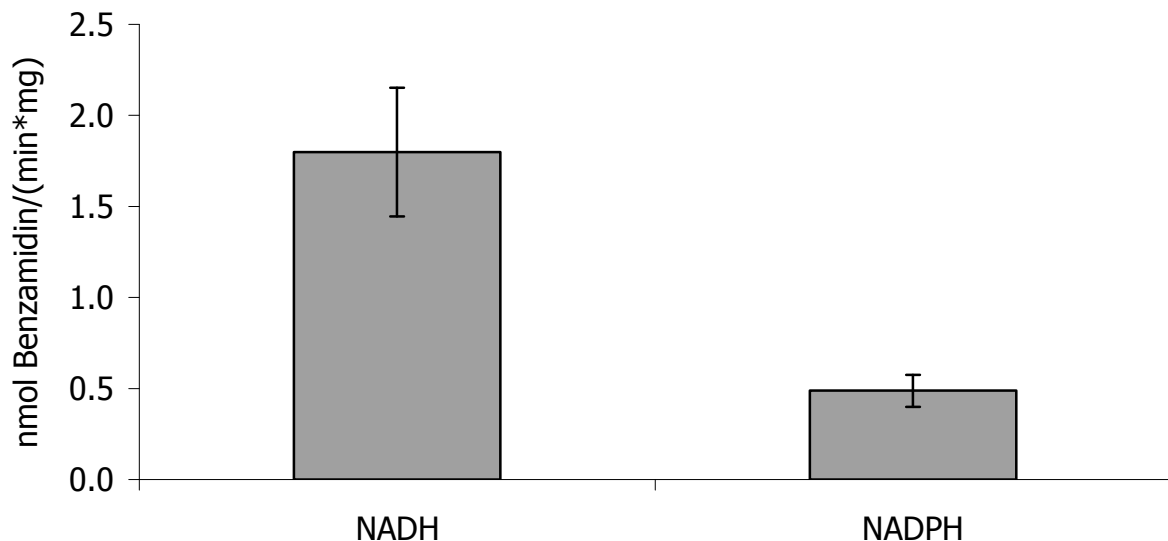


Abb. 4.11 Untersuchung des Einflusses verschiedener Cosubstrate auf die Benzamidoximreduktaseaktivität.

Für die Untersuchung der Cosubstratabhängigkeit wurde bei dem im Kap. 4.2.6.1 beschriebenen Inkubationsabsatz NADH durch die äquimolare Menge NADPH ersetzt. Die ermittelten Umsetzungs-raten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden. Auf statistische Signifikanz wurde unter Verwendung des Student's t-Tests getestet. Sie ist als $p < 0,001$ angegeben.

4.3.2.4 Einfluss von Kaliumcyanid und Kohlenmonoxid auf die *N*-reduktive Aktivität

Cyanidionen und Kohlenmonoxid hemmen hämhaltige Proteine. Während Cyanidionen Enzyme hemmen, deren hämgebundenes Eisen in der Oxidationsstufe +III vorliegt (Ferriform), werden hämhaltige Enzyme der Oxidationsstufe +II durch Kohlenmonoxid gehemmt [Stryer *et al.*, 2003].

Die Begasung des Inkubationsansatzes mit Kohlenmonoxid hat keinen Einfluss auf die Benzamidoxireduktaseaktivität in porcinen Fettgewebsmikrosomen. Zwischen dem mit Kohlenmonoxid begasten Ansatz und der Kontrollinkubation ohne Kohlenmonoxid ist kein signifikanter Aktivitätsunterschied feststellbar ($p = 0,8$) (Abb. 4.14).

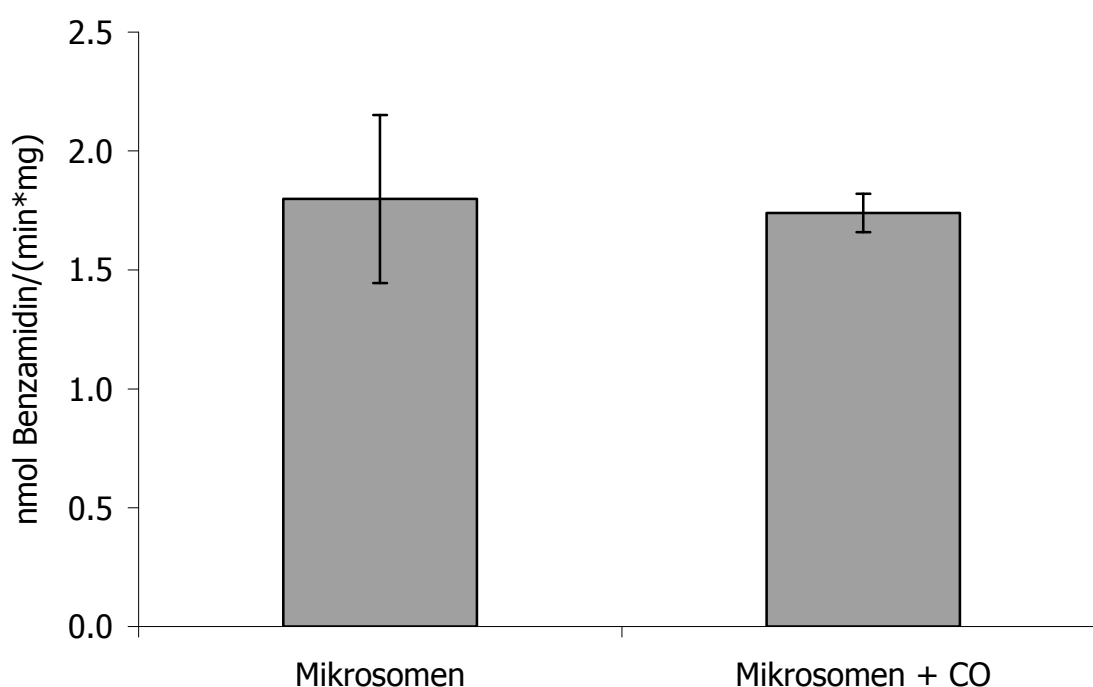


Abb. 4.14 Einfluss von Kohlenmonoxid (CO) auf die Benzamidoximreduktion mit Mikrosomen aus porcinem Fettgewebe.

Die Zusammensetzung der Inkubationsansätze entsprach der in Kap. 4.2.6.1 beschriebenen. Vor der Inkubation wurde der Ansatz für 30 s mit Kohlenmonoxid begast und in verschlossenen Reaktionsgefäßen 3 min vorinkubiert. Die Inkubation wurde schließlich durch Zugabe von Benzamidoxim gestartet. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden. Auf statistische Signifikanz wurde unter Verwendung des Student's *t*-Tests getestet.

Der Zusatz von Kaliumcyanid zu den Inkubationsansätzen führt zu einer 65%-igen Hemmung der Benzamidoximreduktaseaktivität (Abb. 4.15). Eine vollständige Hemmung der Aktivität der Fettgewebismikrosomen mit Kaliumcyanid ist nicht möglich. Die ermittelte IC_{50} ergab 0,3 mM.

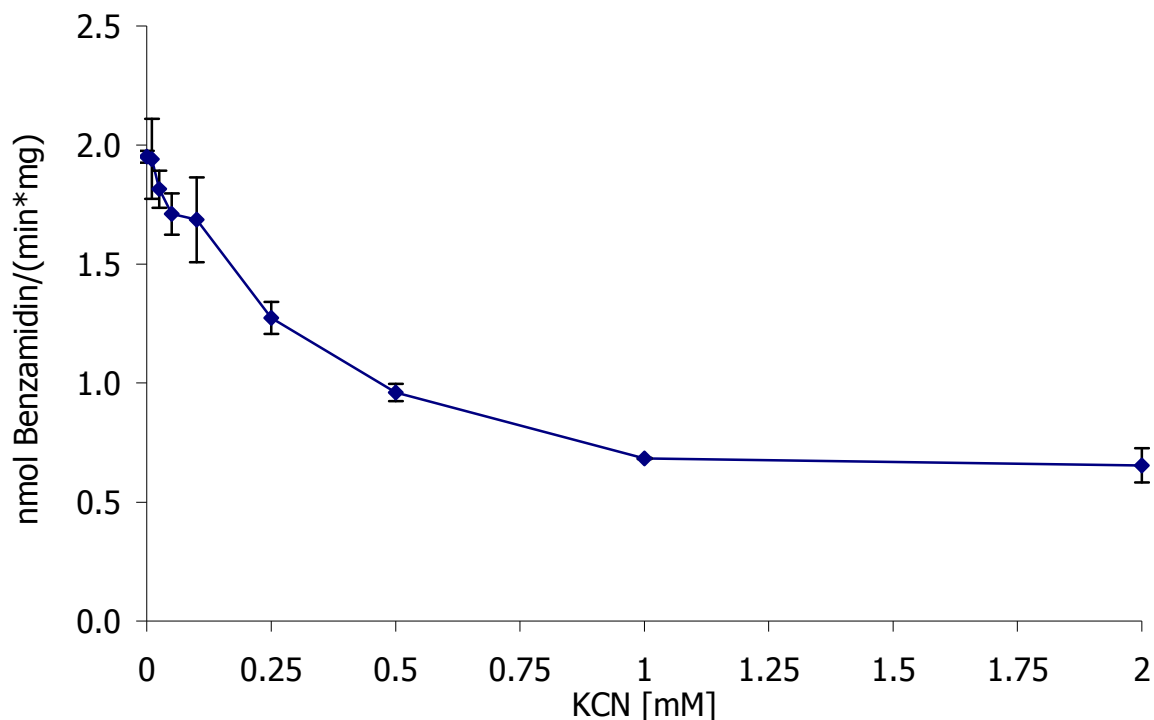


Abb. 4.15 Hemmung der Benzamidoximreduktion mit Mikrosomen aus porcinem Fettgewebe durch KCN.

Der Inkubationsansatz enthielt 10 μ g mikrosomales Protein, 0,5 mM Benzamidoxim und 1,0 mM NADH in 100 μ l 20 mM Tris-Puffer pH 7,4. Nach der 5-minütigen Vorinkubation des mikrosomalen Proteins mit NADH und jeweils unterschiedlichen KCN-Konzentrationen wurde die Reaktion durch Zugabe von Benzamidoxim gestartet. Die weitere Durchführung erfolgte wie in Kap. 4.2.6 beschrieben. Die ermittelten Umsatzraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

4.3.2.5 Hemmung der *N*-reduktiven Aktivität durch Stearoyl-CoA

Für Stearoyl-CoA wurde eine Substrathemmung der Stearoyl-CoA Desaturaseaktivität ab einer Konzentration von 0,05 mM [McDonald und Kinsella, 1973] beschrieben. Die Benzamidoximreduktaseaktivität porciner Fettgewebsmikrosomen wird ebenfalls durch Stearoyl-CoA-Konzentrationen über 0,05 mM gehemmt (IC_{50} : 0,2 mM).

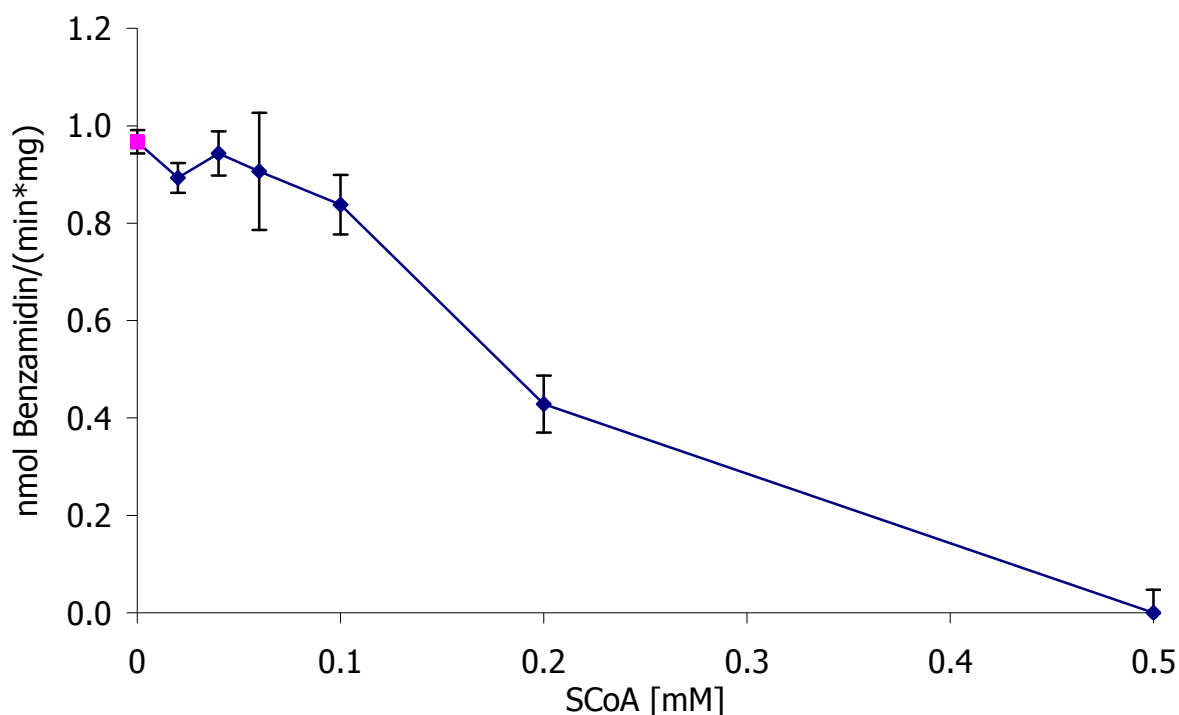


Abb. 4.16 Hemmung der Benzamidoximreduktion mit Mikrosomen aus porcinem Fettgewebe durch Stearoyl-CoA.

Der Inkubationsansatz enthielt 20 μ g mikrosomales Protein, 0,5 mM Benzamidoxim und 1,0 mM NADH in 100 μ l 20 mM Tris-Puffer pH 7,4. Nach der 5-minütigen Vorinkubation des mikrosomalen Proteins mit NADH und jeweils unterschiedlichen Stearoyl-CoA-Konzentrationen wurde die Reaktion durch Zugabe von Benzamidoxim gestartet. Die weitere Durchführung erfolgte wie in Kap. 4.2.6 beschrieben. Die ermittelten Umsetzungsdaten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

4.3.2.6 Hemmung der *N*-reduktiven Aktivität durch Natriumvanadat

Natriumvanadat ist ein Hemmstoff molybdänhaltiger Enzyme [Ramadoss, 1980]. Die Benzamidoximreduktaseaktivität porciner Fettgewebsmikrosomen wird nur zum Teil durch Vanadat gehemmt. Eine vollständige Hemmung der Enzymaktivität kann auch bei höheren Konzentrationen nicht erreicht werden (IC_{50} : 8,4 μ M).

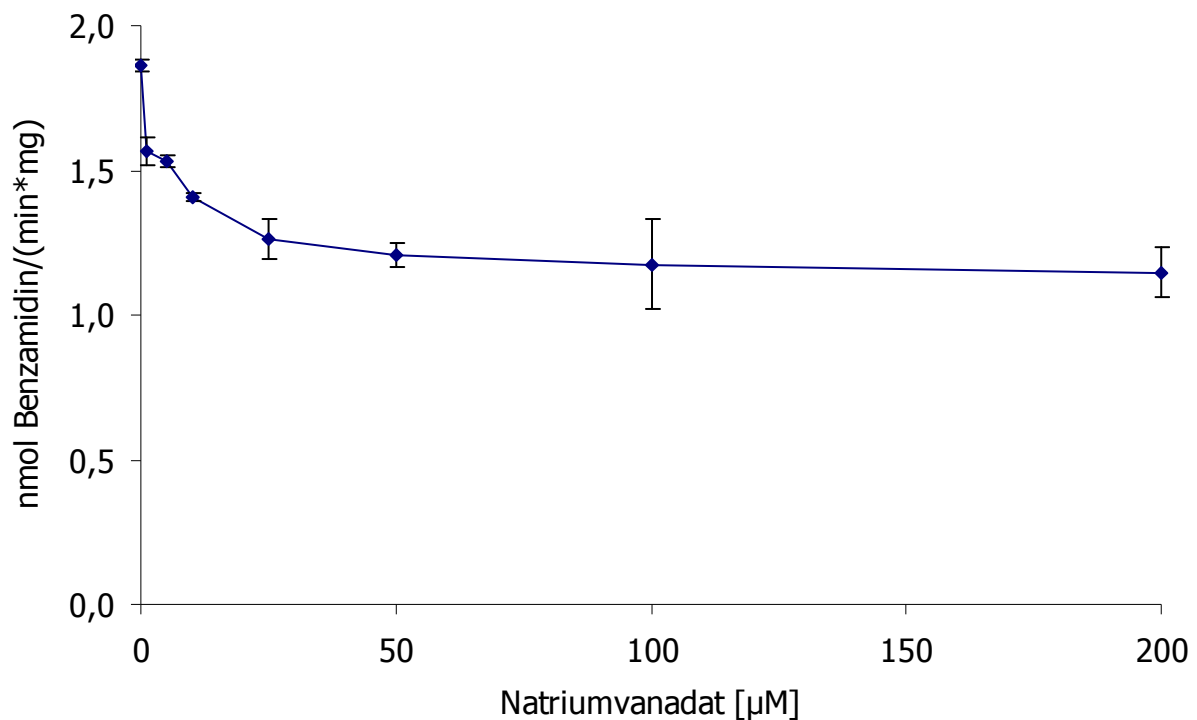


Abb. 4.16 Hemmung der Benzamidoximreduktion mit Mikrosomen aus porcinem Fettgewebe durch Natriumvanadat.

Der Inkubationsansatz enthielt 10 μ g mikrosomales Protein, 0,5 mM Benzamidoxim und 1,0 mM NADH in 100 μ l 20 mM Tris-Puffer pH 7,4. Nach der 5-minütigen Vorinkubation des mikrosomalen Proteins mit NADH und jeweils unterschiedlichen Natriumvanadatkonzentrationen wurde die Reaktion durch Zugabe von Benzamidoxim gestartet. Die weitere Durchführung erfolgte wie in Kap. 4.2.6 beschrieben. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

4.3.2.7 Einfluss eines Anti-SCD Antikörpers auf die *N*-reduktive Aktivität porciner Fettgewebsmikrosomen

Anti-SCD Antikörper binden spezifisch an die Stearoyl-CoA Desaturase. Inkubationen porciner Fettgewebsmikrosomen mit dem Anti-SCD Antikörper bewirken eine signifikante Hemmung der Benzamidoximreduktaseaktivität von 34% ($p = 0,0002$) (Tab. 4.2). Mit dem hitzedenaturierten Antikörper tritt keine signifikante Hemmung ein ($p = 0,13$).

	nmol Benzamidin/ (min*mg Protein)	Aktivität [%]
Mikrosomen	$1,8 \pm 0,2^{*/**}$	100
Mikrosomen + SCD-AK	$1,2 \pm 0,1^*$	66
Mikrosomen + SCD-AK ^a	$1,7 \pm 0,1^{**}$	95

Tab. 4.2 Einfluss eines Anti-SCD Antikörper auf die *N*-reduktive Aktivität porciner Fettgewebsmikrosomen.

Der Inkubationsansatz enthielt 10 µg mikrosomales Protein, 0,5 mM Benzamidoxim, und 1,0 mM NADH in 100 µl 20 mM Tris-Puffer pH 7,4. Nach der 5-minütigen Vorinkubation des mikrosomalen Proteins mit NADH und 5 µl Anti-SCD Antikörper wurde die Reaktion durch Zugabe von Benzamidoxim gestartet. Die weitere Durchführung erfolgte wie in Kap. 4.2.6 beschrieben. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

^a – Der Anti-SCD Antikörper wurde vor der Zugabe zum Inkubationsansatz für 10 min auf 95°C erhitzt. Auf statistische Signifikanz wurde unter Verwendung des Student's *t*-Tests getestet. Sie ist als * $p = 0,0002$ und ** $p = 0,13$ angegeben.

4.3.3 Teilgereinigte Desaturase-induzierte Rattenlebermikrosomen

4.3.3.1 Gehalts- und Aktivitätsbestimmungen

Die teilgereinigten porcinen Fettgewebsmikrosomen wurden auf den Gehalt bzw. die Aktivität der Komponenten des Elektronentransfersystems untersucht. Zudem wurde der P450-Gehalt dieser Präparation ermittelt. Für diese Untersuchungen kamen spektrophotometrische Analysenmethoden zum Einsatz (Kap. 2.2.5).

Der Proteingehalt der teilgereinigten Desaturase-induzierten Rattenlebermikrosomen betrug 1,8 mg/ml.

Der nach der Methode von Estabrook und Werringloer [1978] bestimmte Cyt b₅-Gehalt betrug 0,64 nmol Cyt b₅/mg.

Die Bestimmung der NADH-Cyt b₅-Reduktaseaktivität erfolgte nach einem modifizierten Ferricyanid-Reduktionstest [Mihara und Sato, 1978]. Für die teilgereinigten Desaturase-induzierten Rattenlebermikrosomen wurde eine NADH-Cyt b₅-Reduktaseaktivität von 1,1 U/mg Protein ermittelt.

Der Cytochrom P450-Gehalt von 6,1 nmol/mg wurde nach der Methode von Omura und Sato [1964] ermittelt.

4.3.3.2 Benzamidoximreduktion mit teilgereinigter SCD im rekonstituierten System

Für Inkubationen mit teilgereinigten Desaturase-induzierten Rattenlebermikrosomen (SCD) im rekonstituierten System wurde das von Huang [1982] vorgeschlagene optimale Verhältnis für Cyt b₅/NADH-Cyt b₅-Reduktase von 10/1 verwendet. Die Zugabe teilgereinigter Desaturase-induzierter Rattenlebermikrosomen (SCD) zu den Komponenten des rekonstituierten Systems Cyt b₅/NADH-Cyt b₅-Reduktase im Verhältnis 10/1 bewirkt eine signifikante Steigerung der Benzamidoximreduktaseaktivität ($p = 0,0008$). Das Weglassen des Cosubstrates NADH im Komplettansatz führt zu einer Abnahme der Aktivität auf ca. ein fünftel der Aktivität mit Cosubstrat. Die teilgereinigten Desaturase-induzierten Rattenlebermikrosomen zeigen auch ohne Zusatz der Komponenten des rekonstituierten Systems eine geringe Aktivität (Abb. 4.12).

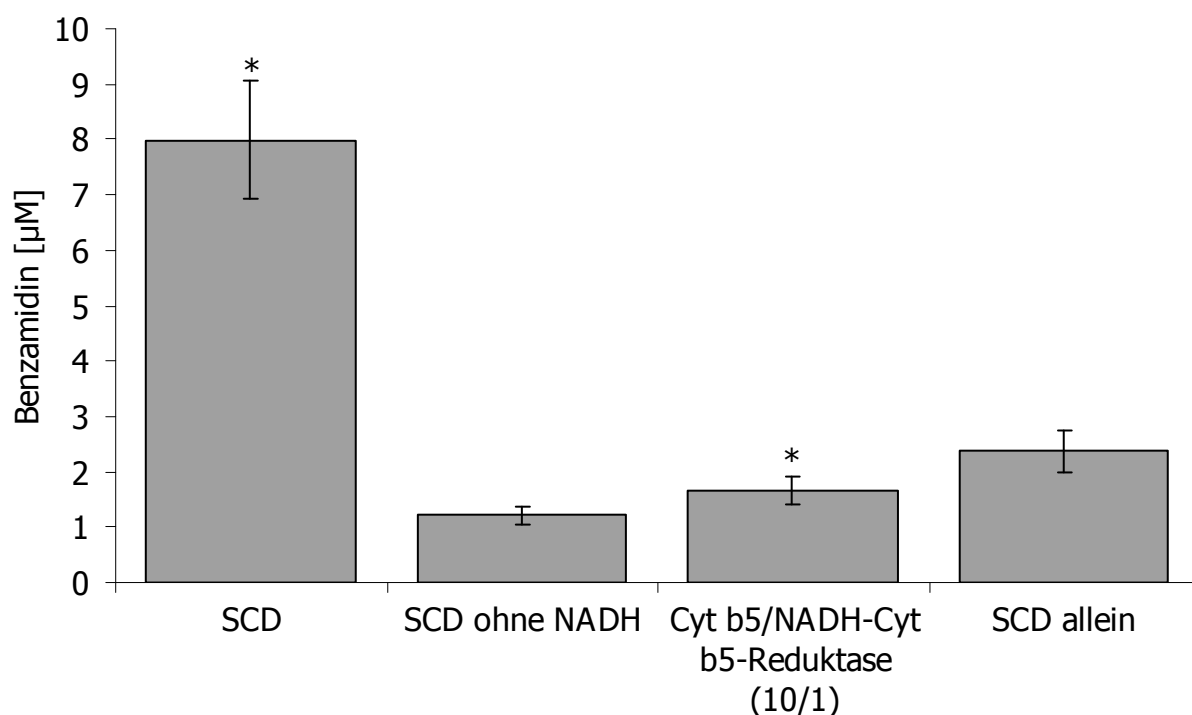


Abb. 4.12 Benzamidoximreduktion mit teilgereinigter SCD im rekonstituierten System.

Zur besseren Vergleichbarkeit wurden nur die Konzentrationen des gebildeten Benzamidins aufgetragen. Der komplette Inkubationsansatz (SCD) enthielt 0,5 mM Benzamidoxim, 1,0 mM NADH, 133 pmol Cyt b₅, 0,03 U NADH-Cyt b₅-Reduktase und 3,3 μg teilgereinigte SCD in einem Gesamtansatz von 100 μl Tris HCl pH 7,4 mit 40 μM DLPC. Die ermittelten Umsetzungsdaten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden. Die statistische Signifikanz nach dem Student's t-Tests ist als * $p = 0,0008$ angegeben.

4.3.3.3 Benzamidoximreduktion im rekonstituierten System in Abhängigkeit vom Cyt b₅/NADH-Cyt b₅-Reduktaseverhältnis

Für die Benzamidoximreduktion mit teilgereinigter SCD im rekonstituierten System werden mit dem Cyt b₅/NADH-Cyt b₅-Reduktaseverhältnis von 10/1 die höchsten Umsetzungsraten erreicht. Eine weitere Steigerung der Cyt b₅-Konzentration im Inkubationsansatz bei konstantem NADH-Cyt b₅-Reduktasegehalt bewirkt eine Abnahme der spezifischen Aktivität (Abb. 4.13).

Die Inkubationen mit dem Zwei-Komponentensystem aus Cyt b₅ und NADH-Cyt b₅-Reduktase im optimierten Verhältnis 10/1 [Huang, 1982; Kurian *et al.*, 2004] zeigen wesentlich geringere Umsetzungsraten als mit dem Drei-Komponentensystem mit der teilgereinigten SCD.

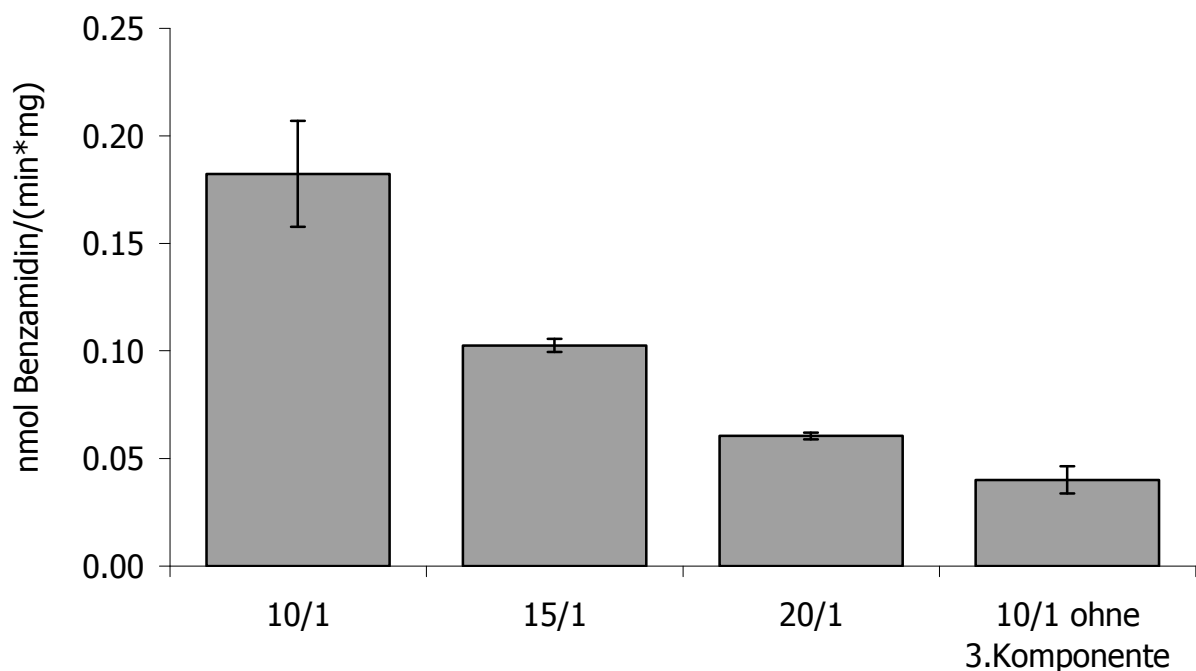


Abb. 4.13 Benzamidoximreduktion im rekonstituierten System in Abhängigkeit vom Verhältnis Cyt b₅/NADH-Cyt b₅-Reduktase.

Der Inkubationsansatz enthielt 0,5 mM Benzamidoxim, 1,0 mM NADH, 0,03 U NADH-Cyt b₅-Reduktase und 3,3 µg teilgereinigte SCD und steigende Mengen Cyt b₅ in einem Gesamtansatz von 100 µl Tris HCl pH 7,4 mit 40 µM DLPC. Die weitere Durchführung erfolgte wie in Kap. 4.2.6 beschrieben. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

4.3.3.4 Einfluss eines Anti-SCD Antikörpers auf die *N*-reduktive Aktivität teilgereinigter Desaturase-induzierter Rattenlebermikrosomen im rekonstituierten System

Anti-SCD Antikörper binden spezifisch an die Stearoyl-CoA Desaturase. Inkubationen teilgereinigter Desaturase-induzierter Rattenlebermikrosomen im rekonstituierten System mit dem Anti-SCD Antikörper bewirken eine signifikante Hemmung der Benzamidoximreduktaseaktivität auf 50% der Ausgangsaktivität ($p = 0,00008$) (Tab. 4.2). Mit dem hitzedenaturierten Antikörper ist auch eine leichte Hemmung zu verzeichnen, deren statistische Signifikanz jedoch fraglich ist ($p = 0,034$).

	pmol Benzamidin/ (min*mg Protein)	Aktivität [%]
teilgereinigte SCD	181 ± 15 ^{*/**}	100
teilgereinigte SCD + SCD-AK	87 ± 13 [*]	48
teilgereinigte SCD + SCD-AK ^a	154 ± 4 ^{**}	86

Tab. 4.3 Einfluss eines Anti-SCD Antikörper auf die *N*-reduktive Aktivität teilgereinigter Desaturase-induzierter Rattenlebermikrosomen.

Der Inkubationsansatz enthielt 3,3 µg teilgereinigte SCD, 133 pmol Cyt *b*₅, 0,03 U NADH Cyt *b*₅-Reduktase, 0,5 mM Benzamidoxim, und 1,0 mM NADH, in 100 µl 20 mM Tris-Puffer pH 7,4 mit 40 µM DLPC. Nach der 5-minütigen Vorinkubation des mikrosomalen Proteins mit NADH und 5 µl Anti-SCD Antikörper wurde die Reaktion durch Zugabe von Benzamidoxim gestartet. Die weitere Durchführung erfolgte wie in Kap. 4.2.6 beschrieben. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

^a - SCD Antikörper wurde vor der Zugabe zum Inkubationsansatz für 10 min auf 95°C erhitzt.

Auf statistische Signifikanz wurde unter Verwendung des Student's *t*-Tests getestet. Sie ist als * $p = 0,00008$ und ** $p = 0,034$ angegeben.

4.3.4 SCD - Aktivitätstest

Die Stearoyl-CoA Desaturaseaktivität wurde vom Arbeitskreis Legrand in Rennes (Frankreich) nach der Methode von Legrand *et al.* [2002] mit Hilfe von radioaktiv markierten Stearoyl-CoA bestimmt (Kap. 4.2.9).

Die Mikrosomen aus porcinem Fettgewebe katalysieren die Oxidation von Stearoyl-CoA mit einer Aktivität von $0,061 \pm 0,001$ nmol Oleoyl-CoA/(min*mg).

4.3.5 Westernblot

Die porcinen Fettgewebismikrosomen und die teilgereinigten Desaturase-induzierten Rattenlebermikrosomen wurden im Westernblot mit einem polyklonalen Anti-SCD Antikörper untersucht. Dabei konnte für die aus dem Fettgewebe gewonnenen Mikrosomen eine Bande bei 41 kDa detektiert werden. Dieses Molekulargewicht entspricht dem der porcinen SCD [Ren *et al.*, 2004]. Die teilgereinigten Desaturase-induzierten Rattenlebermikrosomen zeigten eine Bande bei 37 kDa, welche für SCD aus Rattenleber charakteristisch ist [Ozols, 1997]. Die Unterschiede in der Stärke der detektierten Banden belegen eine deutlich höhere SCD-Konzentration in den teilgereinigten Desaturase-induzierten Rattenlebermikrosomen verglichen mit den Mikrosomen aus porcinem Fettgewebe.

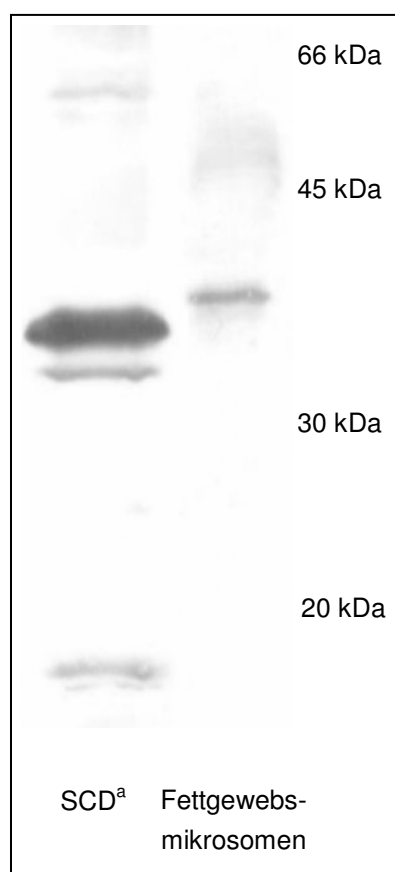


Abb. 4.17 Westernblot mit Anti-SCD Antikörper.

30 µg mikrosomales Protein wurde jeweils aufgetragen, mittels 12% SDS-PAGE nach ihren Molekulargewichten getrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die immunochemische Analyse erfolgte unter Verwendung eines polyklonalen Anti-SCD Antikörpers bei einer Verdünnung von 1:1000 und von Anti-Maus/Kaninchen IgG 1:5000.

SCD^a-Teilgereinigte SCD aus Desaturase-induzierten Rattenlebermikrosomen.

4.4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der SCD auf eine mögliche Beteiligung an der Reduktion von Amidoximen. Für diese Untersuchungen standen zwei Enzymquellen zur Verfügung. Außer Mikrosomen aus porcinem subkutanen Fettgewebe wurden die gereinigten Komponenten des rekonstituierten Systems Cyt b₅ und NADH-Cyt b₅-Reduktase sowie eine teilgereinigte Fraktion aus Desaturase-induzierten Rattenlebermikrosomen verwendet. Der Einsatz von höher gereinigter SCD bzw. rekombinanter SCD ist aus Stabilitätsgründen nicht möglich. Außerdem kamen polyklonale Anti-SCD Antikörper gegen die SCD aus der Ratte in Hemmstudien und im Westernblot zum Einsatz.

Für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurde porcines subkutanes Bauchfett verwendet, da dieses zum einen relativ leicht erhältlich war und zum anderen verglichen mit porciner Leber eine konstante und höhere SCD-Aktivität und -Expressionsrate aufweist [Wang *et al.*, 2004; Ho *et al.*, 1975]. Aus diesem Fettgewebe wurden Mikrosomen gewonnen und charakterisiert.

Zur Identifizierung und Charakterisierung des Amidoxim-reduzierenden Enzymsystems im porcinen Fettgewebe wurden die aus diesem Gewebe gewonnenen Mikrosomen auf Cyt b₅-Gehalt und NADH-Cyt b₅-Reduktaseaktivität untersucht, da sowohl für die Stearoyl-CoA Desaturase- als auch für Benzamidoximreduktaseaktivität die Gegenwart der beiden Komponenten des Elektronentransfersystems notwendig sind. Die untersuchten porcinen Fettgewebsmikrosomen enthielten Cyt b₅ und zeigten auch NADH-Cyt b₅-Reduktaseaktivität.

Da die mikrosomale Benzamidoximreduktase als ein P450-Enzym identifiziert wurde [Clement *et al.*, 1997], war auch der P450-Gehalt der Fettgewebsmikrosomen von Interesse. Das Vorkommen von Cyt P450-Enzymen in Mikrosomen des Fettgewebes ist seit langem bekannt [Seifried und Gaylor, 1976]. Trotzdem konnte mit Hilfe des Kohlenmonoxid-Differenzspektrums nach Omura und Sato [1964] kein Cytochrom P450 detektiert werden. Der äußerst geringe P450-Gehalt in Mikrosomen aus dem Fettgewebe bestätigt die Ergebnisse der Untersuchungen von Seifried und Gaylor [1976]. Diese attestierten dem P450 in Fettgewebsmikrosomen eine extreme Instabilität, da das P450 in diesen Mikrosomen offensichtlich rasch zum P420

umgewandelt wird. Auch die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten porcinen Fettgewebsmikrosomen zeigen die beschriebene Instabilität des P450 (Abb. 4.7). Der P450-Gehalt porciner Fettgewebsmikrosomen ist sehr gering. Daraus folgt, dass P450-Enzyme für die Reduktion *N*-hydroxylierter Amidine in dem betreffenden Gewebe wenn überhaupt nur eine untergeordnete Rolle spielen.

Für die Untersuchung der *in vitro* Reduktion *N*-hydroxylierter Amidine wurde Benzamidoxim als Modells substrat gewählt. Inkubationen porciner Fettgewebsmikrosomen mit Benzamidoxim zeigten, dass diese die Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin katalysieren.

Für *in vitro* Untersuchungen sind Antikörper nützliche Hilfsmittel. Sie sind in der Lage, selektiv an bestimmte Proteine zu binden und können somit deren Aktivität hemmen. Der Zusatz eines polyklonalen Anti-SCD Antikörpers zum Inkubationsansatz mit porcinen Fettgewebsmikrosomen und Benzamidoxim bewirkte eine signifikante Hemmung der Benzamidoximreduktaseaktivität um 35% (Kap. 4.3.3.3). Dies deutet daraufhin, dass zumindest ein Teil der Benzamidoximreduktaseaktivität in porcinen Fettgewebsmikrosomen auf die SCD zurückzuführen ist.

Cyt b₅ und NADH-Cyt b₅-Reduktase sind essentiell für die Aktivität der Stearoyl-CoA Desaturase [Strittmatter *et al.*, 1974]. In Studien mit einem Hemmstoff der NADH-Cyt b₅-Reduktase und alternativen Elektronenakzeptoren konnte auch für die enzymatische Reduktion *N*-hydroxylierter Amidine die entscheidende Bedeutung des Elektronentransfersystems in porcinen Fettgewebsmikrosomen belegt werden. So trat bereits bei geringen Konzentrationen des NADH-Cyt b₅-Reduktaseinhibitors *p*-Hydroxymercuribenzoat [Lostanlen *et al.*, 1978] eine vollständige Hemmung der Benzamidoximreduktaseaktivität ein. Eine vergleichbare Effizienz dieses Inhibitors ist auch für die Hemmung der Desaturaseaktivität beschrieben worden [Raju und Reiser, 1967].

Die Hemmung der Aktivität durch Kaliumhexacyanoferrat(III) [Mihara und Sato, 1978] und Cytochrom c [Bernardi und Azzone, 1981], beides alternative Elektronenakzeptoren des Elektronentransfersystems, bestätigen die Beteiligung des Systems an der Reduktion des Benzamidoxims in den untersuchten mikrosomalen Präparationen.

Porcine Fettgewebismikrosomen katalysieren die Benzamidoximreduktion bei physiologischem pH und unter aeroben Bedingungen. Der Vergleich der Umsetzungs-raten mit NADH oder NADPH als Cosubstrat ergab, dass NADH das bevorzugte Cosubstrat für die Benzamidoximreduktion mit porcinen Fettgewebismikrosomen darstellt. Auch für die Aktivität der Stearoyl-CoA Desaturase wurde NADH als bevorzugtes Cosubstrat unter aeroben Bedingungen im physiologischen pH-Bereich beschrieben [Strittmatter *et al.*, 1974].

Kohlenmonoxid ist ein unspezifischer Hemmstoff von P450 Enzymen, der Häm-gebundenes Eisen(II) blockiert [Stryer *et al.*, 2003]. Die Begasung von Inkubationsansätzen mit Kohlenmonoxid (CO) führte nicht zu einer messbaren Verringerung der Reduktaseaktivität. Nach dem von Clement [2002] postulierten Mechanismus für P450-katalysierte Reduktionen ist Eisen(III) für die Protonenübertragung notwendig, so dass die beobachtete Kohlenmonoxidunempfindlichkeit der Benzamidoximreduktion die Beteiligung von P450-Enzymen nicht unbedingt ausschließt.

Häm-gebundenes Eisen(III) kann durch Cyanidionen blockiert werden. Durch den Zusatz von Kaliumcyanid wurde die Benzamidoxim-reduktive Aktivität porciner Fettgewebismikrosomen auf ca. ein Drittel der gemessenen Ausgangsaktivität gehemmt. Da nach Omura und Sato [1964] kein P450 in den Fettgewebismikrosomen nachgewiesen werden konnte, kann die teilweise Hemmung nicht auf die Hemmung von P450-Isoenzymen zurückgeführt werden. Wahrscheinlicher ist dagegen, dass eine partielle Hemmung des Cyt b₅ durch die Cyanidionen für die Hemmung der Benzamidoximreduktaseaktivität verantwortlich ist. Dies ist möglicherweise auch die Ursache für die beschriebene Cyanidsensitivität der SCD. Auch die SCD-Aktivität ist mit Cyanid nicht vollständig hemmbar [Bloomfield und Bloch, 1960; Hiwatashi *et al.*, 1975; Prasad und Joshi, 1979].

Weitere Gemeinsamkeiten des Amidoxim-reduzierenden Enzyms im Fettgewebe mit der SCD zeigt der Einfluss von Stearoyl-CoA auf die Aktivität der beiden Enzyme.

Ab einer Stearoyl-CoA-Konzentration von 0,05 mM tritt durch Substrathemmung eine Verminderung der Desaturaseaktivität ein [Pande und Mead, 1970; McDonald und Kinsella, 1973]. Die *N*-Hydroxyamidinreduktion porciner Fettgewebismikrosomen wird ebenfalls in vergleichbaren Maßen von Stearoyl-CoA gehemmt wie die von der SCD katalysierte Fettsäureoxidation.

Aufgrund dessen, dass die mitochondriale Benzamidoximreduktion in der porcinen Leber von einem molybdänhaltigen Enzym katalysiert wird [Havemeyer *et al.*, 2006] und auch in Lebermikrosomen Molybdoenzyme nachweisbar sind, wurde der Einfluss molybdänhaltiger Enzyme auf die Benzamidoximreduktaseaktivität porciner Fettgewebsmikrosomen untersucht. Dazu wurden Inkubationen mit Natriumvanadat (einem Hemmstoff von Molybdoenzymen [Ramadoss, 1980]) durchgeführt. Dieser Hemmstoff konnte die Benzamidoximreduktaseaktivität porciner Fettgewebsmikrosomen nur teilweise hemmen. Selbst bei hohen Inhibitorkonzentrationen verblieb eine Restaktivität, die ca. 60% der Ausgangsaktivität entsprach. Im Gegensatz dazu ist Benzamidoximreduktaseaktivität von Mitochondrien aus der Leber nahezu vollständig mit Vanadat hemmbar [Havemeyer *et al.*, 2006]. Somit kann eine gewisse Beteiligung molybdänhaltiger Enzyme an der Reduktion von Amidoximen mit porcinen Fettgewebsmikrosomen nicht gänzlich ausgeschlossen werden, ihr Anteil an der Benzamidoximreduktaseaktivität im Fettgewebe ist jedoch gering.

Aufgrund der schwachen Stabilität der gereinigten membranständigen SCD, die mit einem drastischen Aktivitätsverlust einhergeht [Heinemann *et al.*, 2003], eignete sich dieses Enzym nicht für die Untersuchungen mit dem rekonstituierten System. Bei den in dieser Arbeit verwendeten teilgereinigten Desaturase-induzierten Rattenlebermikrosomen handelt es sich um eine Vorstufe der gereinigten SCD, die bereits einen sehr hohen SCD-Gehalt aufweist, aber auch noch einen gewissen Anteil anderer mikrosomaler Bestandteile enthält, welche offenbar die Stabilität und Aktivität dieses Enzyms günstig beeinflusst. So konnten auch in den teilgereinigten Desaturase-induzierten Rattenlebermikrosomen die beiden Komponenten des Elektronentransfersystems Cyt b_5 und NADH-Cyt b_5 -Reduktase nachgewiesen werden.

Die Zugabe der teilgereinigten Desaturase-induzierten Rattenlebermikrosomen zu den beiden Komponenten des rekonstituierten Systems Cyt b_5 und NADH-Cyt b_5 -Reduktase bewirkte eine signifikante Steigerung der Umsatzrate im Vergleich zur Reduktion des Zweikomponentensystems aus Cyt b_5 und NADH-Cyt b_5 -Reduktase. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Arbeiten von Kurian *et al.* [2004] und Saulter *et al.* [2005], die das Zwei-Komponentensystem aus Cyt b_5 und NADH-Cyt b_5 -Reduktase allein im optimierten Verhältnis (10/1) ohne Beteiligung einer

dritten Komponente als das für die Reduktion *N*-hydroxylierter Amidine verantwortliche Enzymsystem postulierten. Abweichend von den durch die genannten Autoren verwendeten löslichen Formen des Cyt b₅ und der NADH-Cyt b₅-Reduktase wurden in dieser Arbeit die gereinigten, membranständigen Komponenten Cyt b₅ und NADH-Cyt b₅-Reduktase eingesetzt. Zur Überprüfung der Gültigkeit des optimierten Cyt b₅/NADH-Cyt b₅-Reduktaseverhältnis von 10/1 für die membranständigen Komponenten im Drei-Komponentensystem wurde der Anteil an Cyt b₅ bei gleichbleibender NADH-Cyt b₅-Reduktasekonzentration erhöht. Die weitere Cyt b₅-Zugabe führte nicht zu einer Steigerung der Aktivität. Somit konnte gezeigt werden, dass auch für die membranständigen Enzyme im Drei-Komponentensystem das 10/1-Verhältnis ein Optimum für Amidoximreduktion darstellt.

Die beobachtete Benzamidoximreduktaseaktivität der teilgereinigten Desaturase-induzierten Rattenlebermikrosomen ohne Zusatz von Cyt b₅ und NADH-Cyt b₅-Reduktase ist auf den in dieser Präparation vorhandenen Anteil der beiden Komponenten des Elektronentransfersystems zurückzuführen.

Durch die Zugabe von Anti-SCD Antikörper zum Inkubationsansatz der teilgereinigten Desaturase-induzierten Rattenlebermikrosomen im rekonstituierten System trat eine ca. 50%-ige Hemmung der Benzamidoximreduktaseaktivität ein. Verglichen mit den porcinen Fettgewebismikrosomen ist die Hemmwirkung des Anti-SCD Antikörpers auf die teilgereinigten Desaturase-induzierten Rattenlebermikrosomen im rekonstituierten System wesentlich stärker ausgeprägt. Dies ist auf den deutlich höheren Gehalt an SCD in dieser Präparation und der damit verbundenen erhöhten Empfindlichkeit gegen den Anti-SCD Antikörper zurückzuführen.

Die Spezifität des Anti-SCD Antikörpers wurde überprüft, in dem die Hemmung der eigentlich katalysierten Reaktion der SCD (die Oxidation von Stearoyl-CoA zu Oleoyl-CoA) untersucht wurde. Die SCD-Aktivität Desaturase-induzierter Rattenlebermikrosomen konnte durch die Zugabe von Anti-SCD Antikörper um ca. 50% gehemmt werden [unveröffentlichte Daten von J. Ozols]. Dies zeigt, dass die Hemmung der SCD-Aktivität mit der Hemmung der Benzamidoximreduktaseaktivität durch den Anti-SCD Antikörper in den untersuchten Enzympräparationen durchaus vergleichbar ist.

Zur Überprüfung der SCD-Aktivität der gereinigten Fettgewebismikrosomen *in vitro*

wurde die Oxidation von Stearoyl-CoA zu Oleoyl-CoA untersucht. Dieser SCD-Aktivitätstest ergab eine Umsetzungsrate von 61 pmol/(min*mg).

Die Enzymfamilie der membrangebundenen Desaturasen weist eine hohe Sequenzhomologie auf [Knipple *et al.*, 2002; Sperling *et al.*, 2003]. So zeigte der polyklonale Antikörper gegen SCD der Ratte ausreichende Kreuzreaktivität, um auch an porcine SCD binden zu können. Wie im Westernblot ersichtlich (Abb. 4.17) unterscheiden sich die Stearoyl-CoA Desaturasen dieser beiden Spezies in ihrem Molekulargewicht. Dieses beträgt 37 kDa [Ozols, 1997] für die Ratten-SCD und 41 kDa für die Schweine-SCD [Ren *et al.*, 2004]. In den gereinigten porcinen Fettgewebsmikrosomen konnte SCD eindeutig nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Untersuchungen von Wang *et al.* [2004], die hohe Expressionsraten des SCD-Gens im porcinen, subkutanen Fettgewebe fanden.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen deuten auf eine Beteiligung der SCD an der Reduktion *N*-hydroxylierten Amidine im Fettgewebe hin. Für den zweifelsfreien Nachweis einer Beteiligung der SCD an Amidoximreduktionen wären Untersuchungen mit dem reinen Enzym notwendig. Aufgrund der bereits beschriebenen Instabilität der reinen SCD ist eine solche Untersuchung nicht möglich.

Für die Reduktion *N*-hydroxylierter Amidine in anderen Organen wie der Leber und der Niere, spielt die SCD keine relevante Rolle. So ist auch der Beitrag der SCD aus dem Fettgewebe am Gesamtmetabolismus von *N*-Hydroxyamidinen im Organismus als untergeordnet einzustufen. Dennoch ist die in dieser Arbeit beschriebene Amidoximreduktion insbesondere für Substanzen, die aufgrund ihrer hohen Lipophilie im Fettgewebe akkumulieren können, von Relevanz. Es konnte somit erstmals gezeigt werden, dass Desaturasen auch andere Substrate als Fettsäuren akzeptieren und ihnen erstmals eine Rolle im Fremdstoffmetabolismus zugeschrieben werden.

Der Zusatz eines Anti-SCD Antikörpers bewirkte eine Hemmung der Benzamidoxim-reduktaseaktivität in porcinen Fettgewebismikrosomen um 34%. Auch Stearoyl-CoA hemmte ab einer Konzentration von 0,05 mM die *N*-reduktive Aktivität. Diese Ergebnisse sprechen für eine Beteiligung der SCD an der Reduktion *N*-hydroxylierter Amidine im Fettgewebe.

Weitere Hinweise ergaben *in vitro* Untersuchungen mit dem rekonstituierten System. So bewirkte Zugabe der teilgereinigten Desaturase-induzierten Rattenlebermikrosomen zu den beiden Komponenten Cyt b₅ und NADH-Cyt b₅-Reduktase im Verhältnis 10/1 eine signifikante Steigerung der *N*-reduktiven Aktivität im rekonstituierten System. Auch diese Aktivität der teilgereinigten Desaturase-induzierten Rattenlebermikrosomen wurde durch den Anti-SCD Antikörper um 50% gehemmt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen die Beteiligung der SCD an der Aktivierung von Amidoximprodrugs im porcinen Fettgewebe. Der Anteil der SCD am Gesamtmetabolismus *N*-hydroxylierter Amidine spielt eher eine untergeordnete Rolle, wenngleich dies für lipophile Substanzen, die sich im Fettgewebe anreichern können, von Bedeutung ist. Es wird somit erstmals klar gezeigt, dass Desaturasen auch am Fremdstoffmetabolismus beteiligt sein können.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den Grundlagen enzymatischer Reduktionen von Sulfoxiden und *N*-hydroxylierten Amidinen. Die Untersuchung und Charakterisierung der an Reduktionen beteiligten Enzyme ist u. a. für die Entwicklung von Prodrugs von Bedeutung, die durch Reduktionsreaktionen aktiviert werden.

Die enzymatische Reduktion von Sulfoxiden wurde mit porcinen Leberzellkompartimenten sowie der gereinigten Benzamidoximreduktase untersucht. Als Modellsubstrate dienten Thioanisol- und Methioninsulfoxid.

Mit den untersuchten porcinen Leberzellkompartimenten konnte *in vitro* eine DTT-abhängige Sulfoxidreduktaseaktivität im Schwein gezeigt werden. Die Aktivität der Thioanisolsulfoxidreduktion wies kompartimentspezifische Unterschiede auf. Ausgehend von der höchsten Aktivität im Zytosol nahm diese über Mitochondrien zu den Mikrosomen hin ab. Diese Ergebnisse deuten auf die Methioninsulfoxidreduktase als das für diese Reduktion hauptverantwortliche Enzym in der Schweineleber hin.

Die Untersuchungen mit der humanen Methioninsulfoxidreduktase belegen die hohe katalytische Effizienz dieses Enzyms für die Reduktion von Methylsulfoxidgruppen und bilden somit die enzymatische Grundlage für deren Anwendung als Prodrugprinzip.

Für die Benzamidoximreduktase aus porcinen Mikrosomen und Mitochondrien konnte eine Beteiligung an der aeroben Reduktion des Thioanisolsulfoxids zum Thioanisol ausgeschlossen werden.

Die untersuchten porcinen Leberpräparationen wiesen in Gegenwart von DTT Methioninsulfoxidreduktaseaktivität auf. Mit dem rekonstituierten System aus Cyt b₅/NADH-Cyt b₅-Reduktase und der dritten Komponente, welches effizient die Benzamidoximreduktion katalysiert, konnte jedoch keine Methioninsulfoxidreduktaseaktivität detektiert werden.

Weder für die humane Methioninsulfoxidreduktase noch für die porcine Benzamidoximreduktase konnte eine Beteiligung an der Reduktion von Verbindungen einer neuen Substratklasse nachgewiesen werden.

Die erfolgreiche Anwendung des Prodrugprinzips Amidoxime an Stelle von Amidinen begründet das Interesse an enzymatisch katalysierten Reduktionen von *N*-hydroxylierten Amidinen. So wurde das Enzymsystem aus porciner Leber, das diese Reduktion katalysiert, bereits in mehreren Arbeiten charakterisiert [Clement *et al.*, 1997; Clement, 2002; Havemeyer *et al.*, 2006]. Im Fettgewebe ist Benzamidoximreduktaseaktivität bislang nur von Andersson *et al.* [2005] beschrieben worden. Außerdem ließen die Untersuchungen von Johansson *et al.* [2005] eine Beteiligung der SCD an dieser Reduktion vermuten.

Für die Untersuchungen zur Beteiligung der SCD an der Reduktion *N*-hydroxylierter Amidine wurden im Rahmen dieser Arbeit Mikrosomen aus porcinem, subkutanen Fettgewebe gewonnen und charakterisiert. Unter Verwendung des Modellsubstrates Benzamidoxim konnte Amidoximreduktion mit Fettgewebsmikrosomen gezeigt werden. Die Bedingungen der *in vitro* Reduktion der *N*-Hydroxyamide im Fettgewebe stimmen mit denen für die Oxidation von Stearoyl-CoA durch die Stearoyl-CoA Desaturase überein. So NADH ist bei beiden das bevorzugte Cosubstrat der aeroben Reaktion bei physiologischem pH.

Generell weist das verantwortliche Enzym für die Reduktion der *N*-Hydroxyamide im porcinen Fettgewebe Gemeinsamkeiten mit der Stearoyl-CoA Desaturase auf. So ist die Beteiligung eines Elektronentransfersystems aus Cyt b₅ und NADH-Cyt b₅-Reduktase für die Aktivität der SCD bekannt [Strittmatter *et al.*, 1974] und auch in porcinen Fettgewebsmikrosomen konnte die Bedeutung dieser beiden Komponenten für die Reduktion von Benzamidoxim durch Untersuchungen mit Hemmstoffen der einzelnen Komponenten des rekonstituierten Systems bestätigt werden. Weiterhin deutete die signifikante Hemmung der Benzamidoxim-reduktiven Aktivität in porcinen Fettgewebsmikrosomen durch den Zusatz eines Anti-SCD Antikörpers auf eine SCD-Beteiligung an *N*-Reduktionen hin. Auch die für die SCD beschriebene Substrathemmung mit Stearoyl-CoA [Pande und Mead, 1970; McDonald und Kinsella, 1973], bewirkte eine Hemmung der *N*-reduktiven Aktivität porciner Fettgewebsmikrosomen.

In vitro Untersuchungen mit dem rekonstituierten System aus Cyt b₅ und NADH-Cyt b₅-Reduktase (im Verhältnis 10/1) ergaben, dass die Benzamidoximreduktaseaktivität

dieser beiden Komponenten durch die Zugabe der teilgereinigten Desaturase-induzierten Rattenlebermikrosomen signifikant steigerbar ist. Auch diese Aktivität wurde durch den Anti-SCD Antikörper gehemmt.

Unter Verwendung des polyklonalen Anti-SCD Antikörpers im Westernblot konnte SCD in den Mikrosomen des Fettgewebes und in den teilgereinigten Desaturase-induzierten Rattenlebermikrosomen nachgewiesen werden.

Somit sprechen die Ergebnisse dieser Arbeit für eine Beteiligung der Stearoyl-CoA Desaturase an der Aktivierung von Amidoximprodrugs im Fettgewebe, wenngleich der Anteil der SCD an der gesamten *in vivo* Reduktion der Amidoxime im Organismus eher eine untergeordnete Rolle spielt. Für lipophile Substanzen aber, die im Fettgewebe akkumulieren können, ist diese Erkenntnis von Bedeutung. Es wurde erstmals gezeigt, dass Desaturasen auch bei der Umsetzung körperfremder Stoffe eine Rolle spielen können.

6 MATERIALIEN UND GERÄTE

6.1 Substanzen und sonstige Materialien

Die verwendeten Chemikalien stammten, soweit nicht anders in der Tabelle aufgeführt, von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen).

Alle verwendeten Chemikalien wurden in höchster verfügbarer Reinheit bezogen.

Substanz	Firma
Acetonitril	J.T. Baker, Deventer, Holland
Acrylamid	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Ammoniumacetat	Merck KGaA, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Roth GmbH Co.KG, Karlsruhe
BCA-Kit zur Proteinbestimmung	Pierce, Rockford, USA
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt
Chromrgenic Western Blotting Kit® (AP, Mouse/Rabbit)	Roche, Mannheim
Coomassie® Brilliant blue R 250	Serva, Feinbiochemica, Heidelberg
Dithiothreitol	Roth GmbH Co.KG, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid	Merck KGaA, Darmstadt
Eisen(III)Chlorid-Tetrahydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Eisessig	J.T. Baker, Deventer, Holland
Glycin	Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz	Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumcyanid	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumhexacyanoferrat(III)	Merck KGaA, Darmstadt
Kohlenmonoxid	Messer Griesheim GmbH, Krefeld
Maleinsäure	Merck KGaA, Darmstadt

MATERIALIEN UND GERÄTE

Methanol	J.T. Baker, Deventer, Holland
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdithionit	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt
NADH	Merck KGaA, Darmstadt
NADPH	Roche Diagnostics, Mannheim
Nitrocellulose-Membran Protan BA 85	Schleicher & Schüll MicroScience GmbH, Dassel
Blotting Papier GB 002 200x200	Schleicher & Schüll MicroScience GmbH, Dassel
<i>o</i> -Phthaldialdehyd	Fluka Chemie GmbH (Buchs, Schweiz)
<i>Ortho</i> -Phosphorsäure, 85 %	Merck KGaA, Darmstadt
Reaktionsgefäße, 1,5 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

6.2 Geräte

Gerät	Firma
Econo-Chromatographiesäule 2,5*10 cm	Bio-Rad, München
Einmalküvetten mikro, Zentrumshöhe 15 mm, Volumen 70-550 µl	Brandt GmbH & Co. KG, Wertheim
Einmalküvetten, 500-1000 µl	Sarstedt, Nürnberg
Fraktionssammler Redi frac	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Gelelektrophoresekammer Modell 2001	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Blotting-Apparatur LKB 2117-005	LKB, Bromma, Schweden
Gradientenformer GM-1	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Hochleistungszentrifuge J2-21 M/E, Rotor JA 10 und JA 14	Beckman, München
IKA-Vibrax-VXP	Janke & kunkel GmbH & Co KG, Staufen
ISMATEC Schlauchpumpe für Niederdruckchromatographiesäulen Typ MCP ISM 726	ISMATEC Laboratoriumstechnik GmbH, Wertheim-Mondfeld
Jupiter Fleischwolf Typ 885	Jupiter Kitchen Tools GmbH, Schorndorf
Magnetkernrührer MR mini	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Messer-Homogenisator	Eigenbau der Universität Austin, Texas
Millipore Schlauchpumpe für Organperfusion Modell XX8200230	Millipore GmbH, Schwalbach
pH-Messgerät inoLab® pH level 1	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weinheim
Pipetten Reference® Eppendorf	Eppendorf AG, Hamburg
Potter-Elvehjem Homogenisator mit Teflonpistill	B. Braum Biotech International, Melsungen

Schüttelwasserbad GFL 1087	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Spektralphotometer Varian Cary® 50 Bio mit Water Peltier System PVB 150	Varian GmbH, Darmstadt
Temperiereinheit für Gelelektrophoresekammer Julabo C/F20	Julabo, Labortechnik GmbH, Seelbach
Tischzentrifuge Hettich Mikro 200	Hettich Zentrifuge, Tuttlingen
Ultraschallbad, Sonorex, Super RK 510H	Bandelin, Berlin
Ultrazentrifuge L7-65, Rotor 45Ti	Beckman, München
Vortexer VF2	Janke & Kunkel GmbH & Co. KG, Staufen
Waage, MC 1, Laboratory LC 620 S	Sartorius, Göttingen
Waage, MC 1, Research RC 210P	Sartorius, Göttingen
Zweistrahlfotometer Uvikon 930	Kontron, Neufahrn

7 LITERATURVERZEICHNIS

AHIMA, R. S. UND FLIER, J. S.

Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab* (2000) 11:327-32.

ALBERT, A.

Chemical aspects of selective toxicity. *Nature* (1958) 182:421-2.

ANDERSSON, S.; HOFMANN, Y.; NORDLING, A.; LI, X. Q.; NIVELIUS, S.; ANDERSSON, T. B.; INGELMAN-SUNDBERG, M. UND JOHANSSON, I.

Characterization and partial purification of the rat and human enzyme systems active in the reduction of N-hydroxymelagatran and benzamidoxime. *Drug Metab Dispos* (2005) 33:570-8.

ARTWOHL, M.; RODEN, M.; WALDHAUSL, W.; FREUDENTHALER, A. UND BAUMGARTNER-PARZER, S. M.

Free fatty acids trigger apoptosis and inhibit cell cycle progression in human vascular endothelial cells. *Faseb J* (2004) 18:146-8.

AUST, S. D.; ROERIG, D. L. UND PEDERSON, T. C.

Evidence for superoxide generation by NADPH-cytochrome c reductase of rat liver microsomes. *Biochem Biophys Res Commun* (1972) 47:1133-7.

AYMARD, C.; SEYER, L. UND CHEFTEL, J.-C.

Enzymatic Reduction of Methionine Sulfoxide. In Vitro Experiments with Rat Liver and Kidney *Agric. Biol. Chem.* (1979) 43:1869-72.

BAR-NOY, S. UND MOSKOVITZ, J.

Mouse methionine sulfoxide reductase B: effect of selenocysteine incorporation on its activity and expression of the seleno-containing enzyme in bacterial and mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* (2002) 297:956-61.

BEEDHAM, C.

The role of non-P450 enzymes in drug oxidation. *Pharm World Sci* (1997) 19:255-63.

BEHROUZIAN, B.; FAUCONNOT, L.; DALIGAULT, F.; NUGIER-CHAUVIN, C.; PATIN, H. UND BUIST, P. H.

Mechanism of fatty acid desaturation in the green alga *Chlorella vulgaris*. *Eur J Biochem* (2001) 268:3545-9.

BEIRAGHI, S.; ZHOU, M.; TALMADGE, C. B.; WENT-SUMEGI, N.; DAVIS, J. R.; HUANG, D.; SAAL, H.; SEEMAYER, T. A. UND SUMEGI, J.

Identification and characterization of a novel gene disrupted by a pericentric inversion inv(4)(p13.1q21.1) in a family with cleft lip. *Gene* (2003) 309:11-21.

BELANGER, C.; LUU-THE, V.; DUPONT, P. UND TCHERNOF, A.

Adipose tissue intracrinology: potential importance of local androgen/estrogen metabolism in the regulation of adiposity. *Horm Metab Res* (2002) 34:737-45.

BERNARDI, P. UND AZZONE, G. F.

Cytochrome c as an electron shuttle between the outer and inner mitochondrial membranes. *J Biol Chem* (1981) 256:7187-92.

BERNHEIM, M. L.

The hydroxylamine reductase of mitochondria. *Arch Biochem Biophys* (1969) 134:408-13.

BERNHEIM, M. L. UND HOCHSTEIN, P.

Reduction of hydroxylamine by rat liver mitochondria. *Arch Biochem Biophys* (1968) 124:436-42.

BETSCHART, H. R.; JONDORF, W. R. UND BICKEL, M. H.

Differences in adipose tissue distribution of basic lipophilic drugs between intraperitoneal and other routes of administration. *Xenobiotica* (1988) 18:113-21.

BICKEL, M. H.

The role of adipose tissue in the distribution and storage of drugs. *Prog Drug Res* (1984) 28:273-303.

BLOOMFIELD, D. K. UND BLOCH, K.

The formation of delta 9-unsaturated fatty acids. *J Biol Chem* (1960) 235:337-45.

BOSCHI-MULLER, S.; AZZA, S.; SANGIER-CIANFERANI, S.; TALFOURNIER, F.; VAN DORSSELEAR, A. UND BRANLANT, G.

A sulfenic acid enzyme intermediate is involved in the catalytic mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* (2000) 275:35908-13.

BROT, N. UND WEISSBACH, H.

Biochemistry and physiological role of methionine sulfoxide residues in proteins. *Arch Biochem Biophys* (1983) 223:271-81.

BROT, N. UND WEISSBACH, H.

Peptide methionine sulfoxide reductase: biochemistry and physiological role. *Biopolymers* (2000) 55:288-96.

BROT, N.; WEISSBACH, L.; WERTH, J. UND WEISSBACH, H.

Enzymatic reduction of protein-bound methionine sulfoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1981) 78:2155-8.

BUIST, P. H.

Fatty acid desaturases: selecting the dehydrogenation channel. *Nat Prod Rep* (2004) 21:249-62.

CASHMAN, J. R.

Stereoselectivity in S- and N-oxygenation by the mammalian flavin-containing and cytochrome P-450 monooxygenases. *Drug Metab Rev* (1998) 30:675-707.

CASHMAN, J. R.; CELESTIAL, J. R. UND LEACH, A. R.
Enantioselective N-oxygenation of chlorpheniramine by the flavin-containing monooxygenase from hog liver. *Xenobiotica* (1992) 22:459-69.

CHAO, C. C.; MA, Y. S. UND STADTMAN, E. R.
Modification of protein surface hydrophobicity and methionine oxidation by oxidative systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1997) 94:2969-74.

CLEMENT, B.
The N-oxidation of benzamidines in vitro. *Xenobiotica* (1983) 13:467-73.

CLEMENT, B.
Pharmaceutical preparations with an active principle containing modified amidine groups. Germany, DE 432144, WO 9501168, EP 0708640, US 5786383 (1995).

CLEMENT, B.
Oxidation and reduction of nitrogen via CYP450: importance of the reduction of genotoxic N-hydroxylated functional groups. *Biomedical and Health Research* (1998) 25:59-71.

CLEMENT, B.
Reduction of N-hydroxylated compounds: amidoximes (N-hydroxyamidines) as pro-drugs of amidines. *Drug Metab Rev* (2002) 34:565-79.

CLEMENT, B.; BEHRENS, D.; AMSCHLER, J.; MATSCHKE, K.; WOLF, S. UND HAVEMEYER, A.
Reduction of sulfamethoxazole and dapson hydroxylamines by a microsomal enzyme system purified from pig liver and pig and human liver microsomes. *Life Sci* (2005a) 77:205-19.

CLEMENT, B.; BEHRENS, D.; MOLLER, W. UND CASHMAN, J. R.
Reduction of amphetamine hydroxylamine and other aliphatic hydroxylamines by benzamidoxime reductase and human liver microsomes. *Chem Res Toxicol* (2000) 13:1037-45.

CLEMENT, B. UND DEMESMAEKER, M.
Microsomal catalyzed N-hydroxylation of guanfacine and reduction of N-hydroxyguanfacine. *Arch Pharm (Weinheim)* (1997) 330:303-06.

CLEMENT, B.; DEMESMAEKER, M. UND LINNE, S.
Microsomal catalyzed N-hydroxylation of guanabenz and reduction of the N-hydroxylated metabolite: characterization of the two reactions and genotoxic potential of guanoxabenz. *Chem Res Toxicol* (1996) 9:682-8.

CLEMENT, B.; IMMEL, M.; SCHMITT, S. UND STEINMANN, U.
Biotransformation of benzamidine and benzamidoxime in vivo. *Arch Pharm (Weinheim)* (1993b) 326:807-12.

CLEMENT, B.; IMMEL, M.; TERLINDEN, R. UND WINGEN, F. J.

Reduction of amidoxime derivatives to pentamidine in vivo. *Arch Pharm (Weinheim)* (1992) 325:61-2.

CLEMENT, B. UND JUNG, F.

N-hydroxylation of the antiprotozoal drug pentamidine catalyzed by rabbit liver cytochrome P-450 2C3 or human liver microsomes, microsomal retroreduction, and further oxidative transformation of the formed amidoximes. Possible relationship to the biological oxidation of arginine to NG-hydroxyarginine, citrulline, and nitric oxide. *Drug Metab Dispos* (1994) 22:486-97.

CLEMENT, B. UND KUNZE, T.

The reduction of 6-N-hydroxylaminopurine to adenine by xanthine oxidase. *Biochem Pharmacol* (1992) 44:1501-9.

CLEMENT, B. UND LOPIAN, K.

Characterization of in vitro biotransformation of new, orally active, direct thrombin inhibitor ximelagatran, an amidoxime and ester prodrug. *Drug Metab Dispos* (2003) 31:645-51.

CLEMENT, B.; MAU, S.; DETERS, S. UND HAVEMEYER, A.

Hepatic, extrahepatic, microsomal, and mitochondrial activation of the N-hydroxylated prodrugs benzamidoxime, guanoxabenz, and RO 48-3656 ([1-[(2S)-2-[[4-[(hydroxyamino)iminomethyl]benzoyl]amino]-1-oxopropyl]-4-piperidinyl]oxy]-acetic acid). *Drug Metab Dispos* (2005b) 33:1740-47.

CLEMENT, B. UND RAETHER, W.

Amidoximes of pentamidine: synthesis, trypanocidal and leishmanicidal activity. *Arzneimittelforschung* (1985) 35:1009-14.

CLEMENT, B.; SCHMEZER, P.; WEBER, H.; SCHLEHOFER, J. R.; SCHMITT, S. UND POOL, B. L.

Genotoxic activities of benzamidine and its N-hydroxylated metabolite benzamidoxime in *Salmonella typhimurium* and mammalian cells. *J Cancer Res Clin Oncol* (1988a) 114:363-8.

CLEMENT, B.; SCHMITT, S. UND ZIMMERMANN, M.

Enzymatic reduction of benzamidoxime to benzamidine. *Arch Pharm (Weinheim)* (1988b) 321:955-6.

CLEMENT, B.; SCHULTZE-MOSGAU, M. H. UND WOHLERS, H.

Cytochrome P450 dependent N-hydroxylation of a guanidine (debrisoquine), microsomal catalysed reduction and further oxidation of the N-hydroxy-guanidine metabolite to the urea derivative. Similarity with the oxidation of arginine to citrulline and nitric oxide. *Biochem Pharmacol* (1993a) 46:2249-67.

CLEMENT, B. UND WISSEL, S.

Studies on the microsomal N-oxygenation of isothioureas. *Progress in Pharmacology and Clinical Pharmacology* (1991) 8:219-27.

CRIBB, A. E.; SPIELBERG, S. P. UND GRIFFIN, G. P.

N4-hydroxylation of sulfamethoxazole by cytochrome P450 of the cytochrome P4502C subfamily and reduction of sulfamethoxazole hydroxylamine in human and rat hepatic microsomes. *Drug Metab Dispos* (1995) 23:406-14.

DAMANI, L. A.; CROOKS, P. A.; SHAKER, M. S.; CALDWELL, J.; D'SOUZA, J. UND SMITH, R. L.

Species differences in the metabolic C- and N-oxidation , and N-methylation of [14C]pyridine in vivo. *Xenobiotica* (1982) 12:527-34.

DAMBROVA, M.; UHLEN, S.; WELCH, C. J. UND WIKBERG, J. E.

Identification of an N-hydroxyguanidine reducing activity of xanthine oxidase. *Eur J Biochem* (1998) 257:178-84.

DETERS, S.

Aktivierung von N-hydroxylierten Prodrugs durch mitochondriale Enzyme. Kiel, *Dissertation* (2002).

DONATO, M. T.; CASTELL, J. V. UND GOMEZ-LECHON, M. J.

Effect of model inducers on cytochrome P450 activities of human hepatocytes in primary culture. *Drug Metab Dispos* (1995) 23:553-8.

DORAN, O.; MOULE, S. K.; TEYE, G. A.; WHITTINGTON, F. M.; HALLETT, K. G. UND WOOD, J. D.

A reduced protein diet induces stearoyl-CoA desaturase protein expression in pig muscle but not in subcutaneous adipose tissue: relationship with intramuscular lipid formation. *Br J Nutr* (2006) 95:609-17.

DOUGLAS, W. R.

Of pigs and men and research: a review of applications and analogies of the pig, sus scrofa, in human medical research. *Space Life Sci* (1972) 3:226-34.

DUESCHER, R. J.; LAWTON, M. P.; PHILPOT, R. M. UND ELFARRA, A. A.

Flavin-containing monooxygenase (FMO)-dependent metabolism of methionine and evidence for FMO3 being the major FMO involved in methionine sulfoxidation in rabbit liver and kidney microsomes. *J Biol Chem* (1994) 269:17525-30.

DUFIELD, D. R.; WILSON, G. S.; GLASS, R. S. UND SCHONEICH, C.

Selective site-specific fenton oxidation of methionine in model peptides: evidence for a metal-bound oxidant. *J Pharm Sci* (2004) 93:1122-30.

DUGGAN, D. E.; HOOKE, K. F. UND HWANG, S. S.

Kinetics of the tissue distributions of sulindac and metabolites. Relevance to sites and rates of bioactivation. *Drug Metab Dispos* (1980) 8:241-6.

DUGGAN, D. E.; HOOKE, K. F.; RISLEY, E. A.; SHEN, T. Y. UND ARMAN, C. G.
Identification of the biologically active form of sulindac. *J Pharmacol Exp Ther* (1977) 201:8-13.

ELFARRA, A. A. UND KRAUSE, R. J.
Potential roles of flavin-containing monooxygenases in sulfoxidation reactions of l-methionine, N-acetyl-l-methionine and peptides containing l-methionine. *Biochim Biophys Acta* (2005) 1703:183-9.

ENOCH, H. G.; CATALA, A. UND STRITTMATTER, P.
Mechanism of rat liver microsomal stearyl-CoA desaturase. Studies of the substrate specificity, enzyme-substrate interactions, and the function of lipid. *J Biol Chem* (1976) 251:5095-103.

ESTABROOK, R. W. UND WERRINGLOER, J.
The measurement of difference spectra: application to the cytochromes of microsomes. *Methods Enzymol* (1978) 52:212-20.

ETIENNE, F.; RESNICK, L.; SAGHER, D.; BROT, N. UND WEISSBACH, H.
Reduction of Sulindac to its active metabolite, sulindac sulfide: assay and role of the methionine sulfoxide reductase system. *Biochem Biophys Res Commun* (2003) 312:1005-10.

ETTMAYER, P.; AMIDON, G. L.; CLEMENT, B. UND TESTA, B.
Lessons learned from marketed and investigational prodrugs. *J Med Chem* (2004) 47:2393-404.

FAIN, J. N.; BAHOUTH, S. W. UND MADAN, A. K.
TNFalpha release by the nonfat cells of human adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord* (2004) 28:616-22.

FELSTED, R. L.; CHU, A. E. UND CHAYKIN, S.
Purification and properties of the aldehyde oxidases from hog and rabbit livers. *J Biol Chem* (1973) 248:2580-7.

FINKEL, T.
Redox-dependent signal transduction. *FEBS Lett* (2000) 476:52-4.

FINKEL, T. UND HOLBROOK, N. J.
Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* (2000) 408:239-47.

FRIEDRICH, S.
Aktivität und Kinetik eines mikrosomalen CYP2D-Enzyms. Kiel, *Dissertation* (2003).

FUKAZAWA, H.; TOMISAWA, H.; ICHIHARA, S. UND TATEISHI, M.
Purification and properties of methyl sulfoxide reductases from rat kidney. *Arch Biochem Biophys* (1987) 256:480-9.

FULCO, A. J.

Metabolic alterations of fatty acids. *Annu Rev Biochem* (1974) 43:215-41.

GABBITA, S. P.; AKSENOV, M. Y.; LOVELL, M. A. UND MARKESBERY, W. R.

Decrease in peptide methionine sulfoxide reductase in Alzheimer's disease brain. *J Neurochem* (1999) 73:1660-6.

GEYER, H. J.; SCHEUNERT, I.; RAPP, K.; GEBEFUGI, I.; STEINBERG, C. UND KETTRUP, A.

The relevance of fat content in toxicity of lipophilic chemicals to terrestrial animals with special reference to dieldrin and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Ecotoxicol Environ Saf* (1993) 26:45-60.

GUENGERICH, F. P.

Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem Res Toxicol* (2001) 14:611-50.

GUSTAFSSON, D.; NYSTROM, J.; CARLSSON, S.; BREDBERG, U.; ERIKSSON, U.; GYZANDER, E.; ELG, M.; ANTONSSON, T.; HOFFMANN, K.; UNGELL, A.; SORENSEN, H.; NAGARD, S.; ABRAHAMSSON, A. UND BYLUND, R.

The direct thrombin inhibitor melagatran and its oral prodrug H 376/95: intestinal absorption properties, biochemical and pharmacodynamic effects. *Thromb Res* (2001) 101:171-81.

HALLIWELL, B. UND CROSS, C. E.

Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect* (1994) 102 Suppl 10:5-12.

HAMMAN, M. A.; HAEHNER-DANIELS, B. D.; WRIGHTON, S. A.; RETTIE, A. E. UND HALL, S. D.

Stereoselective sulfoxidation of sulindac sulfide by flavin-containing monooxygenases. Comparison of human liver and kidney microsomes and mammalian enzymes. *Biochem Pharmacol* (2000) 60:7-17.

HANSCH, C.; TELZER, B. R. UND ZHANG, L.

Comparative QSAR in toxicology: examples from teratology and cancer chemotherapy of aniline mustards. *Critical Reviews in Toxicology* (1995) 25:67-89.

HANSEL, A.; JUNG S. UND ROßNER, A.

Reversible Methioninoxidation, Funktionsweise. <http://www2.uni-jena.de/med/mzb/Projekte/reversiblemethionin/nachweisreaktivitaet.html> (2007)

HANSEL, A.; KUSCHEL, L.; HEHL, S.; LEMKE, C.; AGRICOLA, H. J.; HOSHI, T. UND HEINEMANN, S. H.

Mitochondrial targeting of the human peptide methionine sulfoxide reductase (MSRA), an enzyme involved in the repair of oxidized proteins. *Faseb J* (2002) 16:911-3.

HAUPTMANN, J.; PAINTZ, M.; KAISER, B. UND RICHTER, M.

Reduction of a benzamidoxime derivative to the corresponding benzamidine in vivo and in vitro. *Pharmazie* (1988) 43:559-60.

HAVEMEYER, A.; BITTNER, F.; WOLLERS, S.; MENDEL, R.; KUNZE, T. UND CLEMENT, B.

Identification of the missing component in the mitochondrial benzamidoxime prodrug-converting system as a novel molybdenum enzyme. *J Biol Chem* (2006) 281:34796-802.

HEBERLING, S.; GIRRESER, U.; WOLF, S. UND CLEMENT, B.

Oxygen-insensitive enzymatic reduction of oximes to imines. *Biochem Pharmacol* (2006) 71:354-65.

HEINEMANN, F. S.; MZIAUT, H.; KORZA, G. UND OZOLS, J.

A microsomal endopeptidase from liver that preferentially degrades stearyl-CoA desaturase. *Biochemistry* (2003) 42:6929-37.

HEINEMANN, F. S. UND OZOLS, J.

Degradation of stearyl-coenzyme A desaturase: endoproteolytic cleavage by an integral membrane protease. *Mol Biol Cell* (1998) 9:3445-53.

HEINEMANN, F. S. UND OZOLS, J.

Stearyl-CoA desaturase, a short-lived protein of endoplasmic reticulum with multiple control mechanisms. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* (2003) 68:123-33.

HIWATASHI, A.; ICHICKAWA, Y. UND YAMANO, T.

Effects of cyanide on stearyl-coenzyme A desaturase activities in microsomes from various mammalian tissues. *Biochim Biophys Acta* (1975) 388:397-401.

HO, S. K. UND ELLIOT, J. I.

Supplemental dietary copper and the desaturation of 1-C¹⁴-stearyl-CoA by porcine hepatic and adipose microsomes. *Canadian Journal of Animal Science* (1973) 53:537-45.

HO, S. K.; ELLIOT, J. I. UND JONES, G. M.

Effects of copper on performance, fatty acid composition of depot fat and fatty acyl desaturase activities in pigs fed a diet with or without supplemental copper. *Canadian Journal of Animal Science* (1975) 55:587-94.

HOLLAND, H. L.

Biotransformation of organic sulfides. *Nat Prod Rep* (2001) 18:171-81.

HOLLOWAY, P. W.

A requirement for three protein components in microsomal stearyl coenzyme A desaturation. *Biochemistry* (1971) 10:1556-60.

HOLMGREN, A.

Thioredoxin. *Annu Rev Biochem* (1985) 54:237-71.

HOLMGREN, A.

Thioredoxin structure and mechanism: conformational changes on oxidation of the active-site sulfhydryls to a disulfide. *Structure* (1995) 3:239-43.

HOLTKAMP, D.

Isolierung eines Prodrug-reduzierenden Enzymsystems aus der Schweineniere. Kiel, *Dissertation* (2007).

HOSHI, T. UND HEINEMANN, S.

Regulation of cell function by methionine oxidation and reduction. *J Physiol* (2001) 531:1-11.

HSU, Y. R.; NARHI, L. O.; SPAHR, C.; LANGLEY, K. E. UND LU, H. S.

In vitro methionine oxidation of Escherichia coli-derived human stem cell factor: effects on the molecular structure, biological activity, and dimerization. *Protein Sci* (1996) 5:1165-73.

HUANG, C. Y.

Determination of binding stoichiometry by the continuous variation method: the Job plot. *Methods Enzymol* (1982) 87:509-25.

HUANG, W.; ESCRIBANO, J.; SARFARAZI, M. UND COCA-PRADOS, M.

Identification, expression and chromosome localization of a human gene encoding a novel protein with similarity to the pilB family of transcriptional factors (pilin) and to bacterial peptide methionine sulfoxide reductases. *Gene* (1999) 233:233-40.

JOHANSSON, E.; NOREN, K.; SJOVALL, J. UND HALLDIN, M. M.

Determination of delta 1-tetrahydrocannabinol in human fat biopsies from marijuana users by gas chromatography-mass spectrometry. *Biomed Chromatogr* (1989) 3:35-8.

JOHANSSON, I.; THELIN, A.; HOFMANN, Y.; ANDERSSON, S.; NORDLING, Å.; LI, Q. X.; CARLSSON, S. C.; ANDERSSON, T. B. UND INGELMAN-SUNDBERG, M. (2005)

Identification of stearoyl CoA desaturase as the enzyme responsible for the reduction of ximelagatran/N-hydroxymelagatran and benzamidoxime in adipocytes, in: *PharmSciFair*, Elsevier, Nice.

JOUNAIDI, Y.

Cytochrome P450-based gene therapy for cancer treatment: from concept to the clinic. *Curr Drug Metab* (2002) 3:609-22.

JUNG, S.; HANSEL, A.; KASPERCZYK, H.; HOSHI, T. UND HEINEMANN, S. H.

Activity, tissue distribution and site-directed mutagenesis of a human peptide methionine sulfoxide reductase of type B: hCBS1. *FEBS Lett* (2002) 527:91-4.

KADLUBAR, F. F.; MCKEE, E. M. UND ZIEGLER, D. M.

Reduced pyridine nucleotide-dependent N-hydroxy amine oxidase and reductase activities of hepatic microsomes. *Arch Biochem Biophys* (1973) 156:46-57.

KADLUBAR, F. F. UND ZIEGLER, D. M.

Properties of a NADH-dependent N-hydroxy amine reductase isolated from pig liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* (1974) 162:83-92.

KAESTNER, K. H.; NTAMBI, J. M.; KELLY, T. J., JR. UND LANE, M. D.

Differentiation-induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes. A second differentially expressed gene encoding stearoyl-CoA desaturase. *J Biol Chem* (1989) 264:14755-61.

KARHAN, W.

Charakterisierung, Struktur-Aktivitäts-Beziehungen und Mechanismus eines mikrosomalen, N-reduktiven Biotransformationssystems. Kiel, *Dissertation* (2002).

KARLSON, P.; DOENECKE, D. UND KOOLMAN, J.

Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. *Georg Thieme Verlag*, Stuttgart (1994).

KASAI, T.; OHGUCHI, K.; NAKASHIMA, S.; ITO, Y.; NAGANAWA, T.; KONDO, N. UND NOZAWA, Y.

Increased activity of oleate-dependent type phospholipase D during actinomycin D-induced apoptosis in Jurkat T cells. *J Immunol* (1998) 161:6469-74.

KERSHAW, E. E. UND FLIER, J. S.

Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* (2004) 89:2548-56.

KIM, H. Y. UND GLADYSHEV, V. N.

Methionine sulfoxide reduction in mammals: characterization of methionine-R-sulfoxide reductases. *Mol Biol Cell* (2004) 15:1055-64.

KITAMURA, S.; SUGIHARA, K. UND OHTA, S.

Drug-metabolizing ability of molybdenum hydroxylases. *Drug Metab Pharmacokinet* (2006) 21:83-98.

KITAMURA, S.; TATSUMI, K.; HIRATA, Y. UND YOSHIMURA, H.

Further studies of sulfoxide-reducing enzyme system. *J Pharmacobiodyn* (1981) 4:528-33.

KLEIN, S.; COPPACK, S. W.; MOHAMED-ALI, V. UND LANDT, M.

Adipose tissue leptin production and plasma leptin kinetics in humans. *Diabetes* (1996) 45:984-87.

KNIPPLE, D. C.; ROSENFELD, C. L.; NIELSEN, R.; YOU, K. M. UND JEONG, S. E.

Evolution of the integral membrane desaturase gene family in moths and flies. *Genetics* (2002) 162:1737-52.

KOWALTOWSKI, A. J. UND VERCESI, A. E.

Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic Biol Med* (1999) 26:463-71.

KRAUSE, R. J.; RIPP, S. L.; SAUSEN, P. J.; OVERBY, L. H.; PHILPOT, R. M. UND ELFARRA, A. A.

Characterization of the methionine S-oxidase activity of rat liver and kidney microsomes: immunochemical and kinetic evidence for FMO3 being the major catalyst. *Arch Biochem Biophys* (1996) 333:109-16.

KRÜGER, P.

Über Abkömmlinge des Benzenylamidoxims. *Ber Dtsch Chem Ges* (1885)

KURIAN, J. R.; BAJAD, S. U.; MILLER, J. L.; CHIN, N. A. UND TREPANIER, L. A.

NADH cytochrome b5 reductase and cytochrome b5 catalyze the microsomal reduction of xenobiotic hydroxylamines and amidoximes in humans. *J Pharmacol Exp Ther* (2004) 311:1171-78.

KUSCHEL, L.; HANSEL, A.; SCHONHERR, R.; WEISSBACH, H.; BROTH, N.; HOSHI, T. UND HEINEMANN, S. H.

Molecular cloning and functional expression of a human peptide methionine sulfoxide reductase (hMsR). *FEBS Lett* (1999) 456:17-21.

KUSCHINSKY, G.; LÜLLMANN, H. UND MOHR, K.

Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. *Georg Thieme Verlag*, Stuttgart (1993).

LAEMMLI, U. K.

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* (1970) 227:680-5.

LEE, S. C. UND RENWICK, A. G.

Sulphoxide reduction by rat intestinal flora and by *Escherichia coli* in vitro. *Biochem Pharmacol* (1995) 49:1567-76.

LEGRAND, P.; CATHELINE, D.; RIOUX, V. UND DURAND, G.

Lauric acid is desaturated to 12:1n-3 by hepatocytes and rat liver homogenates. *Lipids* (2002) 37:569-72.

LEVINE, R. L.; BERLETT, B. S.; MOSKOVITZ, J.; MOSONI, L. UND STADTMAN, E. R.

Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage. *Mech Ageing Dev* (1999) 107:323-32.

LEVINE, R. L.; MOSKOVITZ, J. UND STADTMAN, E. R.

Oxidation of methionine in proteins: roles in antioxidant defense and cellular regulation. *IUBMB Life* (2000) 50:301-7.

LEVISKY, J. A.; BOWERMAN, D. L.; JENKINS, W. W. UND KARCH, S. B.

Drug deposition in adipose tissue and skin: evidence for an alternative source of positive sweat patch tests. *Forensic Sci Int* (2000) 110:35-46.

- LOSTANLEN, D.; VIEIRA DE BARROS, A.; LEROUX, A. UND KAPLAN, J. C.
Soluble NADH-cytochrome b5 reductase from rabbit liver cytosol: partial purification and characterization. *Biochim Biophys Acta* (1978) 526:42-51.
- LOWTHER, W. T.; BROTH, N.; WEISSBACH, H.; HONEK, J. F. UND MATTHEWS, B. W.
Thiol-disulfide exchange is involved in the catalytic mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2000a) 97:6463-8.
- LOWTHER, W. T.; BROTH, N.; WEISSBACH, H. UND MATTHEWS, B. W.
Structure and mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase, an "anti-oxidation" enzyme. *Biochemistry* (2000b) 39:13307-12.
- MAEDLER, K.; SPINAS, G. A.; DYNTER, D.; MORITZ, W.; KAISER, N. UND DONATH, M. Y.
Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acids on beta-cell turnover and function. *Diabetes* (2001) 50:69-76.
- MAN, W. C.; MIYAZAKI, M.; CHU, K. UND NTAMBI, J. M.
Membrane topology of mouse stearoyl-CoA desaturase 1. *J Biol Chem* (2006) 281:1251-60.
- MCDONALD, T. M. UND KINSELLA, J. E.
Stearyl-CoA desaturase of bovine mammary microsomes. *Arch Biochem Biophys* (1973) 156:223-31.
- MENDEL, R. R. UND BITTNER, F.
Cell biology of molybdenum. *Biochim Biophys Acta* (2006) 1763:621-35.
- MERTENS, I. UND VAN GAAL, L. F.
Obesity, hemostasis and the fibrinolytic system. *Obesity Reviews* (2002) 3:85-101.
- MESEGUER, A.; PUCHE, C. UND CABERO, A.
Sex steroid biosynthesis in white adipose tissue. *Horm Metab Res* (2002) 34:731-6.
- MIHARA, K.
Structure and regulation of rat liver microsomal stearoyl-CoA desaturase gene. *J Biochem (Tokyo)* (1990) 108:1022-9.
- MIHARA, K. UND SATO, R.
Detergent-solubilized NADH-cytochrome b5 reductase. *Methods Enzymol* (1978) 52:102-8.
- MINDER, S.; DANIEL, W. A.; CLAUSEN, J. UND BICKEL, M. H.
Adipose tissue storage of drugs as a function of binding competition. In-vitro studies with distribution dialysis. *J Pharm Pharmacol* (1994) 46:313-5.
- MIRANDA-VIZUETE, A.; DAMDIMOPOULOS, A. E. UND SPYROU, G.
cDNA cloning, expression and chromosomal localization of the mouse mitochondrial thioredoxin reductase gene(1). *Biochim Biophys Acta* (1999) 1447:113-8.

MITCHELL, S. C.; NICKSON, R. M.; PORTER, E. R.; JACKSON, W. F.; PRESTON, S. L. UND ZHANG, A. Q.

The fate of diphenyl sulphide, diphenyl sulphoxide and diphenyl sulphone in the rat. *Drug Metabol Drug Interact* (2000) 16:191-206.

MIYAZAKI, M.; JACOBSON, M. J.; MAN, W. C.; COHEN, P.; ASILMAZ, E.; FRIEDMAN, J. M. UND NTAMBI, J. M.

Identification and characterization of murine SCD4, a novel heart-specific stearyl-CoA desaturase isoform regulated by leptin and dietary factors. *J Biol Chem* (2003) 278:33904-11.

MIYAZAKI, M.; KIM, H. J.; MAN, W. C. UND NTAMBI, J. M.

Oleoyl-CoA is the major de novo product of stearyl-CoA desaturase 1 gene isoform and substrate for the biosynthesis of the Harderian gland 1-alkyl-2,3-diacylglycerol. *J Biol Chem* (2001) 276:39455-61.

MIYAZAKI, M. UND NTAMBI, J. M.

Role of stearyl-coenzyme A desaturase in lipid metabolism. *Prostaglandins Leukotrienes Essent Fatty Acids* (2003) 68:113-21.

MOREAU, C.; FROMENT, P.; TOSCA, L.; MOREAU, V. UND DUPONT, J.

Expression and regulation of the SCD2 desaturase in the rat ovary. *Biol Reprod* (2006) 74:75-87.

MOSKOVITZ, J.; BAR-NOY, S.; WILLIAMS, W. M.; REQUENA, J.; BERLETT, B. S. UND STADTMAN, E. R.

Methionine sulfoxide reductase (MsrA) is a regulator of antioxidant defense and lifespan in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2001) 98:12920-5.

MOSKOVITZ, J.; POSTON, J. M.; BERLETT, B. S.; NOSWORTHY, N. J.; SZCZEPANOWSKI, R. UND STADTMAN, E. R.

Identification and characterization of a putative active site for peptide methionine sulfoxide reductase (MsrA) and its substrate stereospecificity. *J Biol Chem* (2000) 275:14167-72.

MOSKOVITZ, J.; WEISSBACH, H. UND BROT, N.

Cloning the expression of a mammalian gene involved in the reduction of methionine sulfoxide residues in proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1996) 93:2095-9.

MUTSCHLER, E.; GEISSLINGER, G.; KROEMER, H. UND SCHÄFER-KORTING, M.

Arzneimittelwirkungen - Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. 8. Aufl., *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft*, Stuttgart (2001).

NEBERT, D. W. UND GONZALEZ, F. J.

P450 genes: structure, evolution, and regulation. *Annu Rev Biochem* (1987) 56:945-93.

NNANE, I. P.; DAMANI, L. A. UND HUTT, A. J.

The effects of a synthetic diet on the pharmacokinetics of ethyl methyl sulphide and its sulfoxide and sulphone metabolites in rats. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* (2001) 26:17-24.

NTAMBI, J. M.

The regulation of stearoyl-CoA desaturase (SCD). *Prog Lipid Res* (1995) 34:139-50.

NTAMBI, J. M.

Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. *J Lipid Res* (1999) 40:1549-58.

NTAMBI, J. M.; BUHROW, S. A.; KAESTNER, K. H.; CHRISTY, R. J.; SIBLEY, E.; KELLY, T. J., JR. UND LANE, M. D.

Differentiation-induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes. Characterization of a differentially expressed gene encoding stearoyl-CoA desaturase. *J Biol Chem* (1988) 263:17291-300.

OGAWA, F.; SANDER, C. S.; HANSEL, A.; OEHL, W.; KASPERCZYK, H.; ELSNER, P.; SHIMIZU, K.; HEINEMANN, S. H. UND THIELE, J. J.

The repair enzyme peptide methionine-S-sulfoxide reductase is expressed in human epidermis and upregulated by UVA radiation. *J Invest Dermatol* (2006) 126:1128-34.

OMURA, T. UND SATO, R.

The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. I. Evidence for Its Hemoprotein Nature. *J Biol Chem* (1964) 239:2370-8.

OZOLS, J.

Degradation of hepatic stearyl CoA D9-desaturase. *Mol Cell Biol* (1997) 8:2281-90.

PANDE, S. V. UND MEAD, J. F.

Inhibition of the stearyl coenzyme A desaturase system by sterculate. *J Biol Chem* (1970) 245:1856-61.

PARK, B. K.; PIRMOHAMED, M. UND KITTERINGHAM, N. R.

The role of cytochrome P450 enzymes in hepatic and extrahepatic human drug toxicity. *Pharmacol Ther* (1995) 68:385-424.

PARK, Y.; STORKSON, J. M.; NTAMBI, J. M.; COOK, M. E.; SIH, C. J. UND PARIZA, M. W.

Inhibition of hepatic stearoyl-CoA desaturase activity by trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid and its derivatives. *Biochim Biophys Acta* (2000) 1486:285-92.

PATTERSON, L. H.; MCKEOWN, S. R.; ROBSON, T.; GALLAGHER, R.; RALEIGH, S. M. UND ORR, S.

Antitumour prodrug development using cytochrome P450 (CYP) mediated activation. *Anticancer Drug Des* (1999) 14:473-86.

PETERLIN-MASIC, L.; CESAR, J. UND ZEGA, A.

Metabolism-directed optimisation of antithrombotics: the prodrug principle. *Curr Pharm Des* (2006) 12:73-91.

PETROPOULOS, I.; MARY, J.; PERICHON, M. UND FRIGUET, B.

Rat peptide methionine sulfoxide reductase: cloning of the cDNA, and down-regulation of gene expression and enzyme activity during aging. *Biochem J* (2001) 355:819-25.

PICOT, C. R.; PERICHON, M.; CINTRAT, J. C.; FRIGUET, B. UND PETROPOULOS, I.

The peptide methionine sulfoxide reductases, MsrA and MsrB (hCBS-1), are downregulated during replicative senescence of human WI-38 fibroblasts. *FEBS Lett* (2004) 558:74-8.

PICOT, C. R.; PETROPOULOS, I.; PERICHON, M.; MOREAU, M.; NIZARD, C. UND FRIGUET, B.

Overexpression of MsrA protects WI-38 SV40 human fibroblasts against H₂O₂-mediated oxidative stress. *Free Radic Biol Med* (2005) 39:1332-41.

POND, S. M. UND TOZER, T. N.

First-pass elimination. Basic concepts and clinical consequences. *Clin Pharmacokinet* (1984) 9:1-25.

PRASAD, M. R. UND JOSHI, V. C.

Purification and properties of hen liver microsomal terminal enzyme involved in stearoyl coenzyme A desaturation and its quantitation in neonatal chicks. *J Biol Chem* (1979) 254:6362-8.

PSCHYREMBEL

Klinisches Wörterbuch. 258. Aufl., Walter de Gruyter & Co, Berlin (1998).

RAJAGOPALAN, K. V.; FRIDOVICH, I. UND HANDLER, P.

Hepatic aldehyde oxidase. I. Purification and properties. *J Biol Chem* (1962) 237:922-8.

RAJU, P. K. UND REISER, R.

Inhibition of fatty acyl desaturase by cyclopropene fatty acids. *J Biol Chem* (1967) 242:379-84.

RAMADOSS, C. S.

Effects of vanadate on the molybdoproteins xanthine oxidase and nitrate reductase: kinetic evidence for multiple site interaction. *Z Naturforsch* (1980) 35: 702-7.

REN, J.; KNORR, C.; HUANG, L. UND BRENIG, B.

Isolation and molecular characterization of the porcine stearoyl-CoA desaturase gene. *Gene* (2004) 340:19-30.

RIPP, S. L.; ITAGAKI, K.; PHILPOT, R. M. UND ELFARRA, A. A.

Methionine S-oxidation in human and rabbit liver microsomes: evidence for a high-affinity methionine S-oxidase activity that is distinct from flavin-containing monooxygenase 3. *Arch Biochem Biophys* (1999) 367:322-32.

RUAN, H.; TANG, X. D.; CHEN, M. L.; JOINER, M. L.; SUN, G.; BROT, N.; WEISSBACH, H.; HEINEMANN, S. H.; IVERSON, L.; WU, C. F. UND HOSHI, T.

High-quality life extension by the enzyme peptide methionine sulfoxide reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2002) 99:2748-53.

SAULTER, J. Y.; KURIAN, J. R.; TREPANIER, L. A.; TIDWELL, R. R.; BRIDGES, A. S.; BOYKIN, D. W.; STEPHENS, C. E.; ANBAZHAGAN, M. UND HALL, J. E.

Unusual dehydroxylation of antimicrobial amidoxime prodrugs by cytochrome b5 and NADH cytochrome b5 reductase. *Drug Metab Dispos* (2005) 33:1886-93.

SCAGLIA, N. UND IGAL, R. A.

Stearoyl-CoA desaturase is involved in the control of proliferation, anchorage-independent growth, and survival in human transformed cells. *J Biol Chem* (2005) 280:25339-49.

SCHALLREUTER, K. U.

Functioning methionine-S-sulfoxide reductases A and B are present in human skin. *J Invest Dermatol* (2006) 126:947-9.

SCHERER, P. E.; WILLIAMS, S.; FOGLIANO, M.; BALDINI, G. UND LODISH, H. F.

A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* (1995) 270:26746-9.

SCHWANDT, P.; DOERR, H. W. UND KRONE, W.

Enzyme activities in adipose tissue. Comparison in the rat, swine and man. *Klin Wochenschr* (1971) 49:358-60.

SEIFRIED, H. E. UND GAYLOR, J. L.

Investigation of microsomal oxygenases of biosynthetic processes. Stearyl-CoA desaturase of adipose tissue and liver. *J Biol Chem* (1976) 251:7468-73.

SHANKLIN, J. UND CAHOON, E. B.

Desaturation and Related Modifications of Fatty Acids¹. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* (1998) 49:611-41.

SHANKLIN, J.; WHITTLE, E. UND FOX, B. G.

Eight histidine residues are catalytically essential in a membrane-associated iron enzyme, stearoyl-CoA desaturase, and are conserved in alkane hydroxylase and xylene monooxygenase. *Biochemistry* (1994) 33:12787-94.

SHAROV, V. S.; FERRINGTON, D. A.; SQUIER, T. C. UND SCHONEICH, C.

Diastereoselective reduction of protein-bound methionine sulfoxide by methionine sulfoxide reductase. *FEBS Lett* (1999) 455:247-50.

SIGALOV, A. B. UND STERN, L. J.

Enzymatic repair of oxidative damage to human apolipoprotein A-I. *FEBS Lett* (1998) 433:196-200.

SIGALOV, A. B. UND STERN, L. J.

Oxidation of methionine residues affects the structure and stability of apolipoprotein A-I in reconstituted high density lipoprotein particles. *Chem Phys Lipids* (2001) 113:133-46.

SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K.; GARTNER, F. H.; PROVENZANO, M. D.; FUJIMOTO, E. K.; GOEKE, N. M.; OLSON, B. J. UND KLENK, D. C.

Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* (1985) 150:76-85.

SMITH, S. B.; MERSMANN, H. J.; SMITH, E. O. UND BRITAIN, K. G.

Stearoyl-coenzyme A desaturase gene expression during growth in adipose tissue from obese and crossbred pigs. *J Anim Sci* (1999) 77:1710-6.

SPERLING, P.; TERNES, P.; ZANK, T. K. UND HEINZ, E.

The evolution of desaturases. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* (2003) 68:73-95.

SPYROU, G.; ENMARK, E.; MIRANDA-VIZUETE, A. UND GUSTAFSSON, J.

Cloning and expression of a novel mammalian thioredoxin. *J Biol Chem* (1997) 272:2936-41.

STADTMAN, E. R.; MOSKOVITZ, J.; BERLETT, B. S. UND LEVINE, R. L.

Cyclic oxidation and reduction of protein methionine residues is an important antioxidant mechanism. *Mol Cell Biochem* (2002) 234-235:3-9.

STADTMAN, E. R.; MOSKOVITZ, J. UND LEVINE, R. L.

Oxidation of methionine residues of proteins: biological consequences. *Antioxid Redox Signal* (2003) 5:577-82.

STEINHILBER, D.; SCHUBERT-ZSILAVECZ, M. UND ROTH, H.

Medizinische Chemie - Targets und Arzneistoffe. *Deutscher Apotheker Verlag*, Stuttgart (2005).

STEPPAN, C. M.; BROWN, E. J.; WRIGHT, C. M.; BHAT, S.; BANERJEE, R. R.; DAI, C. Y.; ENDERS, G. H.; SILBERG, D. G.; WEN, X.; WU, G. D. UND LAZAR, M. A.

A family of tissue-specific resistin-like molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2001) 98:502-6.

STRITTMATTER, P.; SPATZ, L.; CORCORAN, D.; ROGERS, M. J.; SETLOW, B. UND REDLINE, R.

Purification and properties of rat liver microsomal stearyl coenzyme A desaturase. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1974) 71:4565-9.

STRYER, L.; TYMOCZKO, J. L. UND BERG, J. M.

Biochemie. *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg (2003).

SUN, Q. A.; WU, Y.; ZAPPACOSTA, F.; JEANG, K. T.; LEE, B. J.; HATFIELD, D. L. UND GLADYSHEV, V. N.

Redox regulation of cell signaling by selenocysteine in mammalian thioredoxin reductases. *J Biol Chem* (1999) 274:24522-30.

SUZUKI, T.

Development of an automatic estimation system for both the partition coefficient and aqueous solubility. *J Comput Aided Mol Des* (1991) 5:149-66.

TANIGUCHI, H.; IMAI, Y. UND SATO, R.

Role of the electron transfer system in microsomal drug monooxygenase reaction catalyzed by cytochrome P-450. *Arch Biochem Biophys* (1984) 232:585-96.

TATSUMI, K. UND ISHIGAI, M.

Oxime-metabolizing activity of liver aldehyde oxidase. *Arch Biochem Biophys* (1987) 253:413-8.

TATSUMI, K.; KITAMURA, S. UND YAMADA, H.

Involvement of liver aldehyde oxidase in sulfoxide reduction. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* (1982) 30:4585-8.

TATSUMI, K.; KITAMURA, S. UND YAMADA, H.

Sulfoxide reductase activity of liver aldehyde oxidase. *Biochim Biophys Acta* (1983) 747:86-92.

TESTA, B.

Biochemistry of redox reactions. (Hrsg. Testa, B. und Caldwell, J.) Academic Press, London, (1995).

TESTAI, E.

The drug-metabolizing enzymatic system and the experimental tools used for in vitro toxicology for metabolic studies. *Cell Biol Toxicol* (2001) 17:271-85.

THIEDE, M. A. UND STRITTMATTER, P.

The induction and characterization of rat liver stearyl-CoA desaturase mRNA. *J Biol Chem* (1985) 260:14459-63.

TOCHER, D. R.; LEAVER, M. J. UND HODGSON, P. A.

Recent advances in the biochemistry and molecular biology of fatty acyl desaturases. *Prog Lipid Res* (1998) 37:73-117.

TREFOUEL, J.; NITTI, F. UND BOVET, D.

Action of p-aminophenylsulfamide in experimental streptococcus infections of mice and rabbits. *Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de Ses Filiales* (1935) 120:756-8.

TUYNMAN, A.; VINK, M. K.; DEKKER, H. L.; SCHOEMAKER, H. E. UND WEVER, R.
The sulphoxidation of thioanisole catalysed by lactoperoxidase and *Coprinus cinereus* peroxidase: evidence for an oxygen-rebound mechanism. *Eur J Biochem* (1998) 258:906-13.

UNNIKRISHNAN, M. K. UND RAO, M. N.
Antiinflammatory activity of methionine, methionine sulfoxide and methionine sulfone. *Agents Actions* (1990) 31:110-2.

VOGT, W.
Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal. *Free Radic Biol Med* (1995) 18:93-105.

VOUGIER, S.; MARY, J. UND FRIGUET, B.
Subcellular localization of methionine sulfoxide reductase A (MsrA): evidence for mitochondrial and cytosolic isoforms in rat liver cells. *Biochem J* (2003) 373:531-7.

WAGNER, R. C. UND HOSSLER, F. E.
White adipose tissue.
<http://www.udel.edu/biology/Wags/histopage/colorpage/ca/wav.GIF> (2007)

WANG, P. H.; KO, Y. H.; LIU, B. H.; PENG, H. M.; LEE, M. Y.; CHEN, C. Y.; LI, Y. C. UND DING, S. T.
The expression of porcine adiponectin and stearoyl coenzyme a desaturase genes in differentiating adipocytes. *Asian-Australasian J Anim Sci* (2004) 17:588-93.

WAXMAN, D. J.; LIGHT, D. R. UND WALSH, C.
Chiral sulfoxidations catalyzed by rat liver cytochromes P-450. *Biochemistry* (1982) 21:2499-507.

WEISSBACH, H.; RESNICK, L. UND BROTH, N.
Methionine sulfoxide reductases: history and cellular role in protecting against oxidative damage. *Biochim Biophys Acta* (2005) 1703:203-12.

WERNER, M.; BIRNER, G. UND DEKANT, W.
The role of cytochrome P450A1/2 in the sex-specific sulfoxidation of the hexachlorobutadiene metabolite, N-acetyl-S-(pentachlorobutadienyl)-L-cysteine in rats. *Drug Metab Dispos* (1995) 23:861-8.

WRIGHTON, S. A.; SCHUETZ, E. G.; THUMMEL, K. E.; SHEN, D. D.; KORZEKWA, K. R. UND WATKINS, P. B.
The human CYP3A subfamily: practical considerations. *Drug Metab Rev* (2000) 32:339-61.

YOKOGAWA, K.; NAKASHIMA, E. UND ICHIMURA, F.
Effect of fat tissue volume on the distribution kinetics of biperiden as a function of age in rats. *Drug Metab Dispos* (1990) 18:258-63.

YOSHIHARA, S. UND TATSUMI, K.

Guinea pig liver aldehyde oxidase as a sulfoxide reductase: its purification and characterization. *Arch Biochem Biophys* (1985) 242:213-24.

YOSHIHARA, S. UND TATSUMI, K.

Metabolism of diphenyl sulfoxide in perfused guinea pig liver. Involvement of aldehyde oxidase as a sulfoxide reductase. *Drug Metab Dispos* (1990) 18:876-81.

YOSHINARI, K.; OKINO, N.; SATO, T.; SUGATANI, J. UND MIWA, M.

Induction of detoxifying enzymes in rodent white adipose tissue by aryl hydrocarbon receptor agonists and antioxidants. *Drug Metab Dispos* (2006) 34:1081-89.

YOSHINARI, K.; SATO, T.; OKINO, N.; SUGATANI, J. UND MIWA, M.

Expression and induction of cytochromes P450 in rat white adipose tissue. *J Pharmacol Exp Ther* (2004) 311:147-54.

YUBISUI, T. UND TAKESHITA, M.

Characterization of the purified NADH-cytochrome b5 reductase of human erythrocytes as a FAD-containing enzyme. *J Biol Chem* (1980) 255:2454-6.

ZHANG, L.; GE, L.; PARIMOO, S.; STENN, K. UND PROUTY, S. M.

Human stearoyl-CoA desaturase: alternative transcripts generated from a single gene by usage of tandem polyadenylation sites. *J Biochem* (1999) 340 (Pt 1):255-64.

ZHENG, Y.; PROUTY, S. M.; HARMON, A.; SUNDBERG, J. P.; STENN, K. S. UND PARIMOO, S.

Scd3--a novel gene of the stearoyl-CoA desaturase family with restricted expression in skin. *Genomics* (2001) 71:182-91.

ZIEGLER, D. M.

Flavin-containing monooxygenases: catalytic mechanism and substrate specificities. *Drug Metab Rev* (1988) 19:1-32.

Die vorliegende Arbeit entstand am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel auf Anregung und unter der Leitung von

Herrn Prof. Dr. Bernd Clement.

Für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Überlassung des interessanten Promotionsthemas sowie für die mir gewährte Freiheit und Unterstützung beim Forschen möchte ich mich bei meinem Doktorvater herzlich bedanken.

Herrn HD Dr. Thomas Kunze danke ich vor allem für seine kompetenten Hinweise und Ratschläge bei analytischen und biochemischen Fragen.

Bei Prof. Dr. Juris Ozols, Farmington (Connecticut/USA) bedanke ich mich für die Bereitstellung der Anti-SCD Antikörper und der Desaturase-induzierten Rattenlebermikrosomen aber auch für Tipps und Anregungen zur Thematik der Desaturasen.

Für die Durchführung der SCD-Aktivitätstest danke ich Prof. Dr. Philippe Legrand und Daniel Catheline, Rennes (Frankreich).

Für die praktische Einführung in die HPLC-Analytik und in die technischen Grundlagen von Wartung und Reparatur der Anlagen möchte ich mich bei Sven Wichmann bedanken.

Mein weiterer Dank gilt Antje, Dorothea, Ilka, Inga, Juliane, Sabine, Sanja und Petra für die überaus angenehme und unkomplizierte Zusammenarbeit bei der Betreuung des 1. Semesters.

All meinen Kollegen, insbesondere denen der „Reinigungsgruppe“, danke ich für das überaus freundliche und produktive Arbeitsklima.

Für das zügige und sorgfältige Korrekturlesen dieser Arbeit sowie den kritischen aber konstruktiven Hinweisen bedanke ich mich bei Antje, Ilka, Uwe, Juliane und Lucy.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie, deren Unterstützung mir jederzeit gewiss war.

Persönliche Daten

Name	Robert Christian Reh
Geburtsdatum	22. Juli 1976
Geburtsort	Leipzig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schul Ausbildung

1983 bis 1991	Polytechnische Oberschule Leipzig
1991 bis 1996	Anton-Philipp-Reclam Gymnasium Leipzig
1993 bis 1994	Knox Central Highschool in Barbourville, Kentucky/USA
Juni 1996	Allgemeine Hochschulreife

Ersatzdienst

1996 bis 1997	Behindertenfahrdienst bei der Johanniter-Unfall-Hilfe in Leipzig
---------------	--

Studium

WS 1997 bis SS 2002	Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
WS 1999	Auslandssemester an der Université de Bretagne Occidentale in Brest/Frankreich
Juli 2002 bis Dez. 2002	Pharmaziepraktikum an der Karol-Marcinkiewicz-Universität in Posen/Polen
Jan. 2003 bis Juni 2003	Pharmaziepraktikum in der Wellsee-Apotheke in Kiel
25. Juli 2003	Erteilung der Approbation

Promotion und Weiterbildung

seit Oktober 2003	wissenschaftlicher Mitarbeiter am pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und Anfertigung einer Dissertation unter Leitung von Prof. Dr. Bernd Clement
Dezember 2006	Apotheker für pharmazeutische Analytik

Publikationen:

HERMANN, T. W., DOBRUCKI, R., PIECHOCKI, S., RESZTAK, M., REH, R.

Pharmaceutical availability of gliclazide from selected matrix formulation tablets. *Med Sci Monit* (2005) 11:BR181-88.

REH, R., OZOLS, J., CLEMENT, B.

Involvement of stearyl-CoA-desaturase (SCD) in the reduction of amidoxime prodrugs. (*in Vorbereitung*) (2007).

Tagungsbeitrag:

REH, R., CLEMENT, B.

Involvement of stearyl-CoA-desaturase (SCD) in the reduction of amidoxime prodrugs. *Frontiers in Medicinal Chemistry*, Berlin (2007).

Der Inhalt dieser Abhandlung wurde – abgesehen von der Beratung durch meinen Betreuer – selbstständig von mir erarbeitet und in dieser Form zusammengestellt. Die Arbeit hat an keiner anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen.

Kiel, im Oktober 2007

Robert Reh

Die Untersuchung und Charakterisierung der an Reduktionen beteiligten Enzyme ist besonders für die Entwicklung von Prodrugs von Bedeutung, die durch Reduktionsreaktionen aktiviert werden. Die Reduktion von Amidoximen (*N*-Hydroxyamidinen) zu Amidinen ist von besonderem Interesse, da Amidoximgruppen als Prodrugs stark basischer Amidgruppen mit geringer oraler Bioverfügbarkeit fungieren können. Dass auch Sulfoxide als Prodrugfunktion nutzbar sind, beweist das nicht-steroidale Antirheumatikum Sulindac.

In der vorliegenden Arbeit wurde durch *in vitro* Untersuchungen mit porcinen Leberpräparationen und Methionin- sowie Thioanisolsulfoxid eine DTT-abhängige Sulfoxidreduktion unter aeroben Bedingungen gezeigt. An dieser Reduktion konnte eine Beteiligung der gereinigten mikrosomalen und mitochondrialen Benzamidoximreduktase aus der porcinen Leber ausgeschlossen werden.

Des Weiteren wurde im Rahmen dieser Arbeit die enzymatische Reduktion von *N*-hydroxylierten Amidinen im Fettgewebe in Hinblick auf eine mögliche Beteiligung der Stearoyl-CoA Desaturase (SCD) untersucht. Dazu wurden porcine Fettgewebemikrosomen gewonnen und charakterisiert. An Hand von *in vitro* Untersuchungen der Benzamidoximreduktaseaktivität dieser Mikrosomen mit Hemmstoffen der SCD wurde auf eine Beteiligung dieses Enzyms an der Reduktion *N*-hydroxylierter Amidine geprüft.

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen eine Beteiligung der SCD an der Reduktion von Amidoximprodrugs und zeigen erstmals, dass dieses Enzym auch Fremdstoffe als Substrat akzeptieren kann.

The investigation and characterization of enzymes capable of catalyzing reductions has especially an importance for the development of reductive activated prodrugs. The reduction of amidoximes (*N*-hydroxyamidines) to amidines is of great relevance since amidoxime groups can serve as prodrugs for strongly basic amidines with poor oral bioavailability. The non steroidal antirheumatic agent Sulindac gives evidence, that the sulfoxide moiety can be utilized in prodrugs.

This study reports an aerobe, DTT dependent sulfoxide reduction using *in vitro* tests with porcine liver preparations and methionine as well as thioanisole sulfoxide. Participation of benzamidoxime reductase purified from porcine liver can be excluded.

Furthermore, this study investigates the enzymatic reduction of *N*-hydroxylated amidines in porcine adipose tissue particularly with regard to a possible participation of the enzyme stearoyl CoA desaturase (SCD). For that purpose adipose tissue microsomes were prepared and characterized. By means of *in vitro* tests of the benzamidoxime reductase activity of these microsomes using SCD inhibitors, the role of SCD in the reduction of *N*-hydroxylated amidines was investigated.

The results of this study support an actual participation of SCD in the reduction of amidoxime prodrugs and demonstrate for the first time that SCD can also accept foreign compounds (xenobiotics) as substrates.